

Stressspezifische Freisetzung verschiedener POMC-Fragmente bei diversen Belastungssituationen unter Berücksichtigung trainingsbedingter und saisonaler Einflussfaktoren

Inaugural Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Blumenthal, Ulrich
aus Bonn

Giessen 2005

Aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. F. Dreyer
des Universitätsklinikums Gießen

1.Gutachter: Prof. Dr. H. Teschemacher

2.Gutachter: HSD Dr. M. Niepmann

Tag der Disputation: 15.05.2006

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Einleitung.....	7
1.1. Proopiomelanocortin (POMC) und POMC-Fragmente.....	7
1.2. Freisetzung von POMC-Fragmenten unter Stress.....	8
1.3. POMC-Fragmente.....	9
1.3.1. ACTH.....	9
1.3.2. β_H -Endorphin-immunoreaktives Material (β_H -End-IRM) / β_H -Endorphin (1-31) (β_H -End (1-31)).....	10
1.3.2.1. Biosynthese / β_H -Endorphin-Derivate.....	10
1.3.2.2. Mögliche Funktionen im Organismus.....	11
1.3.3. N-Acetyl- β_H -Endorphin-immunoreaktives Material (Nac-End-IRM).....	13
1.3.4. β -MSH-immunoreaktives Material (β -MSH-IRM).....	14
1.4. POMC-Fragmente bei physischer Belastung.....	16
1.5. POMC-Fragmente bei psychischer Belastung.....	17
1.6. Nachweisverfahren der POMC-Fragmente.....	18
1.6.1. ACTH.....	18
1.6.2. β -End-IRM, Nac-End-IRM, β -MSH-IRM, β -End (1-31).....	18
2. Aufgabenstellung.....	20
3. Material.....	21
3.1. Chemikalien, Reagenzien, Testsubstanzen.....	21
3.2. Pufferlösungen.....	22
3.3. Geräte und Zubehör.....	22
3.4. Software.....	23
3.5. Statistik-Beratung.....	23

4.	Methoden	24
4.1.	Versuchsaufbau der Stresssituationen	24
4.1.1.	Probanden	24
4.1.2.	Belastungssituationen	24
4.1.2.1.	Zeitlicher Verlauf	25
4.1.2.2.	Laktatstufentest	25
4.1.2.3.	Standardbelastung - Monate 1 bis 6	26
4.1.2.4.	Belastung A	26
4.1.2.5.	Belastung B	27
4.1.2.6.	Psychische Belastung	27
4.2.	Kontrollparameter	27
4.2.1.	Bestimmung der Leistung	27
4.2.2.	Bestimmung der Herzfrequenz	27
4.2.3.	Bestimmung von Laktat	28
4.3.	Gewinnung / Aufbereitung der Blutproben	28
4.4.	Methoden zur Bestimmung der POMC-Derivate	28
4.4.1.	Methode zur Bestimmung von ACTH (1-39)	28
4.4.2.	Methoden zur Bestimmung von β_H -Endorphin-IRM, β_H -Endorphin (1-31), N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM, β -MSH-IRM	29
4.4.2.1.	Plasmaextraktion	29
4.4.2.2.	Lyophilisation	31
4.4.2.3.	Immunometrische Nachweisverfahren	31
4.4.2.4.	Fluid Phase-One Site Radioimmunoassays	31
4.4.2.5.	Charakteristika der Fluid Phase-One Site Radioimmunoassays	34
4.4.2.6.	Fluid Phase-Two Site Immunopräzipitations-Radioimmunoassay	35
4.4.2.7.	Charakteristika des Fluid Phase-Two Site Immunopräzipitations- Radioimmunoassays	38
4.4.2.8.	Auswertung der Radioimmunoassays	38
4.5.	Statistik	39

5.	Ergebnisse	40
5.1.	Physische Belastung	40
5.1.1.	Physische Belastungssituationen: Kontrollparameter	40
5.1.1.1.	Leistung	40
5.1.1.2.	Herzfrequenz	42
5.1.1.3.	Laktat	43
5.1.2.	Physische Belastungssituationen: POMC-Derivate	44
5.1.2.1.	ACTH (1-39)	44
5.1.2.2.	β_H -Endorphin-IRM	47
5.1.2.3.	β_H -Endorphin (1-31)	49
5.1.2.4.	N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM	51
5.1.2.5.	β -MSH-IRM	55
5.2.	Psychische Belastungssituation	56
6.	Diskussion	58
6.1.	Diskussion der Methoden	59
6.1.1.	Nachweisverfahren	59
6.1.1.1.	Extraktion	59
6.1.1.2.	Aliquotieren	60
6.1.1.3.	Radioimmunometrische Nachweisverfahren	60
6.1.1.4.	Statistische Auswertung	62
6.1.2.	Physische Belastungssituationen	66
6.1.3.	Psychische Belastung	67
6.2.	Diskussion der Ergebnisse	67
6.2.1.	Kontrollparameter	67
6.2.2.	ACTH (1-39)	68
6.2.3.	β_H -Endorphin	75
6.2.3.1.	β_H -Endorphin-IRM	75
6.2.3.2.	β_H -Endorphin (1-31)	77
6.2.3.3.	N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM	80
6.2.4.	β -MSH-IRM	83

6.2.5.	Psychische Belastungssituation	86
6.3.	Stressspezifische Freisetzung von POMC-Derivaten	87
6.4.	Schlussfolgerung	90
7.	Zusammenfassung	96
8.	Literatur	97
9.	Veröffentlichungen / Vorträge	109
10.	Danksagung	110
11.	Lebenslauf	111

Verzeichnis der verwendeten AbkürzungenPOMC-Fragmente:

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
β_{H} -LPH	β -Lipotropin (human, Mensch)
β_{H} -End	β -Endorphin (human, Mensch)
β_{H} -End-IRM	β -Endorphin-immunoreaktives-Material (human, Mensch)
CLIP	Corticotropin-like intermediate lobe Peptide
JP	Joining Peptide
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
Nac-End-IRM	N-Acetyl- β_{H} -Endorphin-immunoreaktives-Material (human, Mensch)
NT-Fr.	N-terminales Fragment
POMC	Proopiomelanocortin

Dimensionen:

$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
cm	Centimeter
cpm	Counts per minute (gemessene Zerfälle eines Radioisotopes pro Minute)
d	Tag
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
h	Stunde
l	Liter
min	Minute
mol / M	Molar
m	Milli (10^{-3})
μ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
p	Pico (10^{-12})
f	Femto (10^{-15})
sec	Sekunde
t	Zeit
V	Volumen

Weitere Abkürzungen:

A. bidest.	Aqua bidestillata
------------	-------------------

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AS	Aminosäuren
AVP	Arginin-Vasopressin
BA	Blutabnahme
BSA	Bovines Serumalbumin
CRF	Corticotropin-Releasing-Factor
CRH	corticotropin releasing hormone
GARGG	Goat-Anti-Rabbit-Immunoglobulin G
HF	Herzfrequenz
IgG	Immunglobulin G
¹²⁵ I	Radioaktives Jodisotop 125
IRM	immunoreaktives Material
Lsg.	Lösung
MC	Melanocortin-Rezeptor
mean	Mittelwert
Mittelw.	Mittelwert
NRS	Norma rabbit serum, normales Kaninchenserum
PAS	Protein A-Sepharose
PC	Puffer C (Zusammensetzung siehe 3.2.)
PD	Puffer D (Zusammensetzung siehe 3.2.)
pH	Potentia hydrogenii (-log [H ⁺])
Prob.	Proband
RIA	Radioimmunoassay
sd	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
vs.	versus
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZNS-KernG	Kerngebiete im zentralen Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Proopiomelanocortin (POMC) und POMC-Fragmente

Proopiomelanocortin (POMC) ist ein Protein, das als Präkursor für eine Vielzahl von Peptiden wie beispielsweise ACTH, β -Endorphin oder α -, β -, γ -MSH dient. In größerer Menge wurde POMC aus der Hypophyse isoliert, peripher konnten POMC-Fragmente beispielsweise in der Haut, in der Milz, dem Nebennierenmark, im Gastrointestinaltrakt und in weiteren Organen des menschlichen Körpers nachgewiesen werden.

POMC ist mit 7665 Basenpaaren auf Chromosom 2 codiert. Es besteht aus drei Exons und zwei Introns, die als Vorlage für das Transkript dienen. Die Translation führt zum Prä-POMC, aus dem nach Abspaltung eines Signalpeptides POMC mit 241 Aminosäuren entsteht. Stimulierend auf die Biosynthese wirken Hormone wie Arginin-Vasopressin (AVP) und das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH), während Glucocorticoide (negativer Feedbackmechanismus) und Dopamin einen hemmenden Einfluss auf die Synthese haben. Somit stellt POMC einen Bestandteil der Hypothalamus - Hypophysen-Nebennieren-Achse dar [Bertagna et al. (1994); Höllt et al. (1993); Castro et al. (1997)].

POMC wird bei niederen Spezies in zwei verschiedenen Zelltypen in kleinere Fragmente zerlegt. In den corticotrophen Zellen wird POMC zu dem „16 K-Fragment“, zu ACTH und zu β -Lipotropin (β -LPH) gespalten. Ein geringer Teil des β -LPH wird weiter in β -Endorphin und γ -LPH gespalten. In den melanotrophen Zellen entstehen α -, β -, γ -MSH, das so genannte „Joining Peptide“, Corticotropin-like intermediate lobe Peptide (CLIP), sowie die acetylierten Formen von β -Endorphin-Fragmenten (Nac-End) [Knigge et al. (1984); Mc Loughlin et al. (1993); Young et al. (1993)].

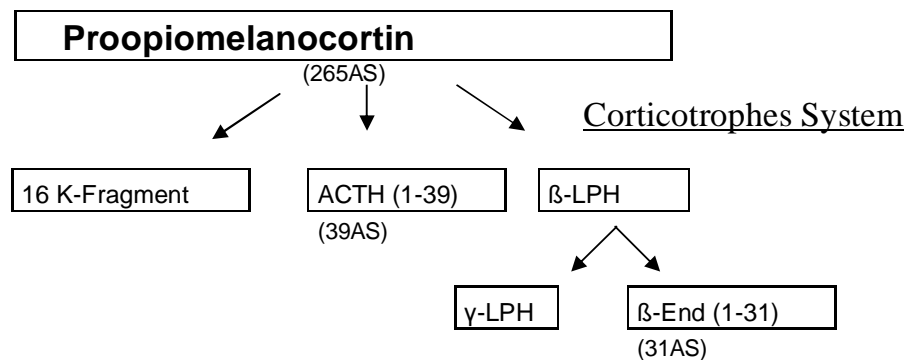


Abb. 1.1-1 Struktur von POMC und seinen Spaltprodukten im corticotrophen System. In Klammern ist die Anzahl der Aminosäuren angegeben.

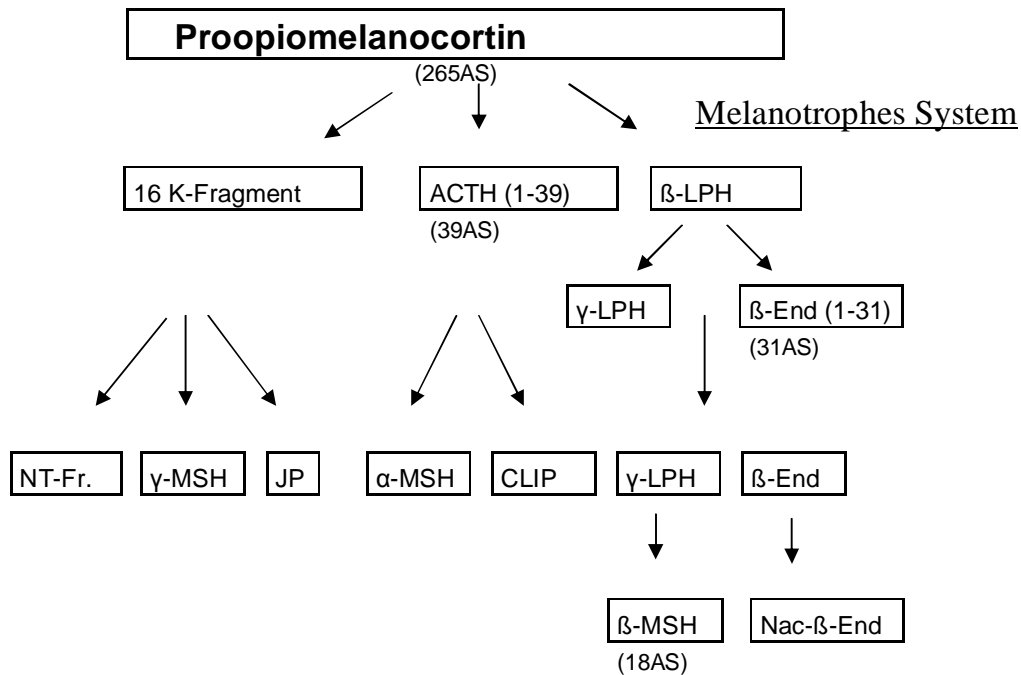


Abb. 1.1-2 Struktur von POMC und seinen Spaltprodukten im melanotropen System. In Klammern ist die Anzahl der Aminosäuren angegeben.

1.2. Freisetzung von POMC-Fragmenten unter Stress

Der Mensch ist verschiedenen Formen von Stress ausgesetzt. In Meyers großem Taschenlexikon (1990) findet man folgende Definition:

„**Stress**, von H.Selye 1936 geprägter Begriff für ein generelles Reaktionsmuster, das Tiere und Menschen als Antwort auf erhöhte Beanspruchung zeigen. Diese Beanspruchungen (**Stressoren**) können z.B. physikalischer (Kälte, Hitze, Lärm), chemischer (Schadstoffe, Drogen), medizinischer (Infektion) oder psychischer Art (Isolation, Prüfung, Belastung in der Familie, Schule oder Berufswelt) sein.“

Wird der menschliche Organismus Stress oder Belastungen ausgesetzt so lassen sich Reaktionen wie beispielsweise ein Anstieg der Herzfrequenz, des Blutdrucks und der Atemfrequenz als „Stress-Antwort“ beobachten. Es existiert somit ein System („Stress-System“), welches diese Reaktionsmuster hervorruft, um den Körper und seine Funktionen an die neu auftretenden Belastungssituationen anzupassen („Adaptation“), und das „Gleichgewicht / Homöostase zwischen Belastung und Körperfunktion“ wiederherzustellen [Chrousos et al. (1998), (2002)].

Zu einem solchen „Stress-System“ gehört bekannterweise das „Sympathiko-Adrenerge System“. Es hat sich aber auch gezeigt, dass auf hormonaler Ebene unter verschiedenen Arten von Belastungen eine Aktivierung des POMC-Systems erfolgt.

POMC wird unter Stress / Belastung exprimiert und dann in seine Fragmente gespalten. Es ist jedoch nicht zwingend gegeben, dass sowohl das corticotrophe als auch das melanotrophe System parallel aktiviert werden. Ebenso können die Fragmente je nach Belastung auch innerhalb eines Systems in völlig unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen nachgewiesen werden.

Bisher sind die funktionelle Bedeutung sowie das biologische Konzept von POMC und seinen Fragmenten im Rahmen von „Stress“, „Stress-System“ oder „Stress-Adaptation“ weitestgehend unbekannt.

1.3. POMC-Fragmente

In dieser Studie wurden folgende POMC-Fragmente bestimmt:

- ACTH
- β_H -Endorphin-immunoreaktives Material
- β_H -Endorphin (1-31)
- N-Acetyl- β_H -Endorphin-immunoreaktives Material
- β -MSH-immunoreaktives Material

1.3.1. ACTH

Das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH (1-39)) wird beim Menschen in der Adenohypophyse durch Spaltung von POMC gebildet. Es wird in Sekretgranula in der Hypophyse gespeichert und nach Bedarf über Exocytose ins Blut freigesetzt. Die Freisetzung steht unter Kontrolle von CRF (Corticotropin releasing factor), welcher im Hypothalamus gebildet wird. ACTH selbst führt zu einer Freisetzung von Glucocorticoiden aus der Nebennierenrinde [Ganong et al. (1987)]. Eine verstärkte Ausschüttung von CRF und somit ACTH finden wir bei physischem und psychischem Stress sowie bei erniedrigten Corticoidspiegeln. Hohe Konzentrationen an Corticosteroiden im Blutplasma führen über einen negativen Feedbackmechanismus zur verminderten Freisetzung von ACTH und CRF.

Die ACTH-Freisetzung in Ruhe unterliegt einem circadianen Rhythmus mit einem Peak in den frühen Morgenstunden und einem Tief in den Nachtstunden.

Die Funktionen von ACTH sind vielfältig. Sie können zum Teil spezifischen Sequenzen des ACTH-Moleküls zugeordnet werden. ACTH (1-13) zeigt MSH-Aktivität, ACTH (1-24) ist bei allen Vertebraten identisch und entfaltet seine biologische Aktivität an der Nebennierenrinde und an Fettzellen. ACTH (25-39) steht für die Spezifität. ACTH (4-9) ist eine Aminosäuresequenz, die dreimal – zum Teil mit geringfügiger Variation – in dem Protein POMC vorkommt: Es handelt sich um α -, β - und γ -MSH. Dieser Sequenz werden neuromodulatorische Effekte zugeschrieben. In Tierexperimenten konnte ein Einfluss auf Lernprozesse nachgewiesen werden, beim Menschen scheint es Auswirkungen auf die „selektive Aufmerksamkeit“ auszuüben [Silbernagel (2003)].

ACTH spielt entweder über seine direkte Wirkung oder indirekte Wirkung über die Freisetzung von Corticoiden eine zentrale Rolle im Fett-, Kohlenhydrat-, oder Eiweißstoffwechsel. Es beeinflusst den Elektrolythaushalt und zeigt immunmodulatorische Effekte sowie Effekte im zentralen Nervensystem.

Eine zusammenfassende Darstellung von ACTH-Rezeptoren und dessen Funktionen ist Tab. 1.3-3 zu entnehmen.

Die Rolle von ACTH im Rahmen der „Stressadaptation“ ist weitestgehend unbekannt.

1.3.2. β_H -Endorphin-immunoreaktives Material (β -End-IRM) /

β_H -Endorphin (1-31) (β_H -End (1-31))

1.3.2.1. Biosynthese / β_H -Endorphin-Derivate

β_H -Endorphin ist ein POMC-Fragment mit 31 Aminosäuren und wird über die Spaltung von POMC über das Zwischenprodukt β -LPH gebildet. Es kann weiteren Bearbeitungsprozessen wie einer Fragmentierung oder N-terminalen-Acetylierung (melanotrophes System) unterliegen. Die folgende Abbildung zeigt mögliche β -Endorphinderivate:

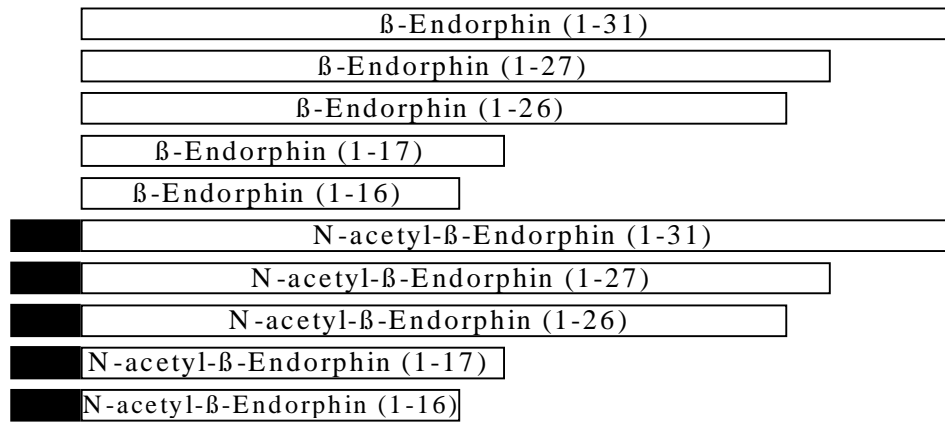


Abb. 1.3-1 β -Endorphin-Derivate.

Der Nachweis von authentischem β -Endorphin (1-31) unterliegt einigen Störfaktoren. Die gängigen Nachweisverfahren weisen nicht nur β -Endorphin (1-31) nach, sondern auch die verschiedenen β -Endorphinderivate sowie β -LPH [Cumming et al. (1987)]. Die Kreuzreaktivität mit β -LPH der verschiedenen Verfahren aus den Studien liegt zwischen 1,5 % und 100 % [Farrell et al. (1987); Rahkila et al. (1988)]. Daher spricht man korrekterweise von β -Endorphin-immunoreaktivem Material. Einige Studien weisen ein festes molares Verhältnis zwischen β -Endorphin und β -LPH nach [Elias et al. (1989); Oleshansky et al. (1990)], während andere Studien diese Aussagen widerlegen [McLouglin et al. (1993)].

Die Nachweisproblematik ist ein Grund, warum die funktionelle Bedeutung von β -Endorphin im „Stresssystem“ bisher nicht geklärt ist. Daher kommt in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zu den herkömmlichen Verfahren ein Assay zur Anwendung, der hochspezifisch authentisches β_{H} -Endorphin (1-31) nachweist [Harbach et al. (2000); Schulz et al. (2000)].

1.3.2.2. Mögliche Funktionen im Organismus

β -Endorphin ist neben ACTH das bekannteste POMC-Fragment. Populistisch wird es als „Glückshormon“ bezeichnet, das beispielsweise für die „Stimmungssteigerung“ beim Schokoladeessen und beim Marathonläufer für den „Kick“ oder „runners high“ verantwortlich gemacht wird. Wissenschaftlich gesehen müssen diese Aussagen kritisch betrachtet werden [Hoffmann et al. (1996)].

Erstmals wurde β -Endorphin 1977 aus einer Kamelhypophyse isoliert [Li et al. (1977)]. Seitdem wurde β -Endorphin-immunoreaktives Material unter Verwendung unterschiedlicher Nachweistekniken in vielen verschiedenen Organen von Menschen und Tieren nachgewiesen

[Nakai et al. (1978); Aleem et al. (1986); Vuolteenaho et al. (1980); Hahn von Dorsche et al. (1992)]

Erhöhte β -Endorphin-Plasmakonzentrationen können nach sportlicher Belastung nachgewiesen werden. Hierzu kommt es häufig, wenn die Belastung entweder zu einer anaeroben Stoffwechsellaage im Körper führt (Lactat $> 4\text{mmol/l}$ oder $\text{VO}_{2\text{max}} > 75\%$) [Schwarz und Kindermann (1990); Sforzo et al. (1988)], oder eine aerobe Dauerbelastung vorliegt [Heitkamp et al. (1993)].

Unklar bleibt aber die Funktion von β -Endorphin in diesen Stresssituationen. Die Annahme, dass dieses POMC-Fragment in den Glucosestoffwechsel eingreift, um „Energien“ für die Belastung bereitzustellen, wird kontrovers diskutiert [Goldfarb et al. (1997); Evans et al. (1997); Jamurtas et al. (2001)]. Die Frage, inwieweit β -Endorphin in einen Zusammenhang mit verändertem Schmerzempfinden bei sportlicher Belastung gebracht werden kann, wird in der Literatur ebenfalls nicht einheitlich beantwortet [Drost et al. (1991); Stein et al. (1991) Tseng et al. (2001)]. Es zeigt sich jedoch, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen einer Acidose bzw. dem „base excess“- Wert / ph-Wert und der β -Endorphin-Konzentration im Blutplasma gibt [Taylor et al. (1994)].

β -Endorphin kann nicht nur im peripheren Gewebe nachgewiesen werden, sondern auch im zentralen Nervensystem (ZNS). Hier stehen seine Funktionen in engem Zusammenhang mit Opioidrezeptoren. Die folgende Tabelle gibt Aufschluss über „mögliche“ Funktionen von β -Endorphin im ZNS als Agonist an Opioidrezeptoren:

Rezeptor	Agonist	Funktion	Anatomie / Lokalisation
$\mu 1 / \mu 2$	β -Endorphin	Reduktion von Angst / Schmerz Kardio-vaskuläre Effekte Respiratorische Depression Stimmungsmodulation Thermoregulation Essverhalten Wasserhaushalt Endokrine Aufgaben Immunmodulation	Thalamus, ZNS-KernG, Rückenmark ZNS-KernG, Rückenmark ZNS-KernG Cortex, Thalamus, ZNS-KernG Hypothalamus Hypothalamus, ZNS-KernG Hypothalamus ZNS-KernG, Thalamus

Rezeptor	Agonist	Funktion	Anatomie / Lokalisation
δ	β -Endorphin	Reduktion von Angst Kardio-vaskuläre Effekte Stimmungsmodulation Thermoregulation Endokrine Aufgaben Immunmodulation	Rückenmark ZNS-KernG Cortex, Thalamus Hypothalamus ZNS-KernG, Thalamus
κ	(β -Endorphin)	Reduktion von Angst / Schmerz Kardio-vaskuläre Effekte Stimmungsmodulation Essverhalten Wasserhaushalt Endokrine Aufgaben	Rückenmark Hypothalamus, ZNS-KernG Cortex, Thalamus, Amygdala Hypothalamus, ZNS-KernG Hypothalamus

Tab. 1.3-2 β -Endorphin als Agonist an Opioidrezeptoren; Anatomie / Lokalisation; „mögliche Funktion“ (ZNS-KernG: verschiedene Kerngebiete im zentralen Nervensystem) [Hoffmann et al. (1996); Mizoguchi et al. (2002)].

Viele der in Tab. 1.3-2 dargestellten Zusammenhänge zwischen β -Endorphin und seinen Funktionen sind bis heute nicht geklärt, zum Teil sogar umstritten und Gegenstand vieler aktueller Forschungsarbeiten, wie folgende Beispiele zeigen: „Die Rolle von β -Endorphin im Energiehaushalt“ [Appleyard et al. (2003); Silva et al. (2002)], β -Endorphin bei Schizophrenie und Depressionen [Bernstein et al. (2002); Zangen et al. (2002)], β -Endorphin im Zusammenhang mit dem menschlichen Immunsystem [Peijie et al. (2003); Hale et al. (2003)], oder β -Endorphin und Schmerz [Matejec et al. (2003); Tseng et al. (2001)]. Die Spaltung und Freisetzung von β -Endorphin als auch N-Acetyl- β -Endorphin ist nicht nur auf die Zellen des ZNS beschränkt, sondern ist auch in den Kardiozyten, speziell in den Vorhöfen nachgewiesen worden [Millington et al. (1999)]. Dieses Studienergebnis stärkt die These des Einflusses von POMC-Fragmenten auf das Herz-Kreislaufsystem.

1.3.3. N-Acetyl- β _H-Endorphin-immunoreaktives Material (Nac-End-IRM)

Es ist ein POMC-Derivat des melanotrophen Systems. Durch eine N-terminale Acetylierung von β -Endorphin entsteht N-Acetyl- β -Endorphin (Nac-End-IRM). Es existieren verschiedene N-Acetyl- β -Endorphin Derivate (siehe Abb. 1.3-1).

Die Erkenntnisse über N-Acetyl- β -Endorphin-IRM sind begrenzt. Sie stammen aus tierexperimentellen Studien und zeigen teilweise kontroverse Ergebnisse.

Stress hat offenbar Einfluss auf die Nac-End-IRM-Konzentration im Plasma, jedoch scheint die Art und Intensität des Stressors eine Rolle zu spielen. Kältestress bei Karpfen führt zu einem Anstieg der Konzentration von Nac-End-IRM im Plasma [van den Burg et al. (2003)]. Stress bei Fischen durch eingeschränkten Schwimmraum führt zu unterschiedlichen Ergebnissen. In der Akutphase kommt es bei Regenbogenforellen zu einem signifikanten Abfall der Hormonkonzentration [Balm et al. (1995)], während bei Seebrassen keine Plasmaveränderung, wohl aber ein Anstieg von Nac-End-IRM in der Hypophyse beobachtet werden kann [Rotllant et al. (2001)]. Chronischer Stress wiederum führt hierbei zu einer Aktivierung des melanotropen Systems mit einem Konzentrationsanstieg von Nac-End-IRM im Plasma [Rotllant et al. (2000)].

Studien, in denen dieses POMC-Derivat im menschlichen Plasma nachgewiesen wurde, sind nicht bekannt.

Über Synthese und Speicherung von N-Acetyl- β -Endorphin-IRM in der Hypophyse wurde berichtet [Stevens et al. (1996); Evens et al. (1994)]. Offensichtlich scheint dieses Hormon einen „modulierenden“ Einfluss sowohl auf Opioidrezeptoren als auch auf den α_2 -Rezeptor auszuüben [Sanchez-Blazquez et al. (1995), (1993), (1992)].

Die Funktionen von N-Acetyl- β -Endorphin-IRM sind unklar, einige Studien zeigen jedoch, dass β -Endorphin-IRM und N-Acetyl- β -Endorphin-IRM sogar gegenseitig antagonisierende Effekte haben können [Tsuji et al. (1989); Ellerkmann et al. (1993)].

1.3.4. β -MSH-immunoreaktives Material (β -MSH-IRM)

β -MSH-(1-18) ist ein POMC-Fragment des melanotropen Systems. Über mehrstufige Spaltungen durch Endopeptidasen entsteht aus POMC das β -MSH über β -LPH und γ -LPH (siehe Abb. 1.1-2).

Die Funktion von β -MSH ist weitestgehend unklar. Es liegen uns zur Zeit keine Studien vor, die im Plasma von menschlichen Probanden β -MSH im Zusammenhang mit physischem oder psychischem Stress nachweisen. Die meisten Informationen über dieses Fragment resultieren aus Zellversuchen sowie Tierversuchen mit Ratten, denen das POMC-Fragment appliziert wurde.

Bislang sind fünf verschiedene Melanocortinrezeptoren MC1 bis MC5 bekannt, an denen mit unterschiedlicher Affinität und Potenz POMC-Fragmente binden können. Die Dichte der Rezeptoren in den unterschiedlichen Organen ist über Tierexperimente gut erforscht.

Rezeptor	Agonist	Expression	Funktion
MC1	ACTH> β -MSH	Leukozyten, Geschlechtszellen Astrozyten und andere zentrale Angriffspunkte	Immunmodulation, antiinflammatorische Effekte, Hautpigmentierung
MC2	ACTH	Nebennierenrinde	Fettstoffwechsel
MC3	ACTH= β -MSH	Hypothalamus, Placenta Verdauungsorgane	Kardiovaskuläre Funktion, Thermo- regulation, Kontrolle von Nahrungs- aufnahme / Essverhalten
MC4	ACTH> β -MSH	ZNS, Nebennierenmark	Eingriff ins autonome Nervensystem und in neuroendokrine Funktionen Gewichtskontrolle+Nahrungsaufnahme Einfluss auf Reaktionsmuster wie Angst, Depression und Stress
MC5	ACTH= β -MSH	Haut, Nebenniere, Skelettmuskulatur Milz, Thymus, Hoden, Ovarien, Leber, Schilddrüse, ZNS und andere Organe	Funktion bislang unklar und spekulativ: Fettstoffwechsel ? Wasserhaushalt ? Thermoregulation ?

Tab. 1.3-3 Zusammenfassende Darstellung über die Melanocortinrezeptoren MC1 bis MC5, ihre Agonisten, Vorkommen und ihre möglichen / vermuteten Funktionen [Starowicz et al. (2003)].

Viele Funktionen des ACTHs und seine Wirkung an den Melanocortinrezeptoren sind nachgewiesen. Anders verhält es sich jedoch mit β -MSH. Die Ergebnisse der bisherigen Studien (Tab. 1.3-3) sagen lediglich aus, an welche Melanocortinrezeptoren sich möglicherweise β -MSH in vivo binden kann. Diese Rezeptoren werden weiterhin in Zusammenhang mit gewissen Funktionen gebracht. Es darf jedoch nicht der Umkehrschluss folgen, dass das POMC-Fragment für eine bestimmte Funktion, wie in der Tabelle aufgeführt, verantwortlich ist. Hierzu fehlt bislang auch der „in Vivo-Nachweis“ von β -MSH im menschlichen Plasma oder Liquor cerebrospinalis in Ruhe und unter definierten Versuchsbedingungen.

1.4. POMC-Fragmente bei physischer Belastung

Wird der menschliche Organismus physischen Belastungen ausgesetzt, so verbraucht der Körper mehr Energie. Diese wird durch die Verbrennung von Glucose und Sauerstoff zur Verfügung gestellt. Findet dieser Vorgang unter Überschuss an O₂-Angebot statt, spricht man von einer aeroben Stoffwechsellage. Gerät der Körper auf Grund der Belastung in eine Sauerstoffschuld, spricht man von einer anaeroben Stoffwechsellage. Hier wird Glucose nicht im Zitratzyklus verbrannt, sondern es wird Energie (in geringerem Ausmaß) durch die Bildung von Laktat gewonnen. Somit kann zwischen einer aeroben und anaeroben Belastungsform unterschieden werden. Der Plasmalaktatwert kann unter Vorbehalt als Indikator für die Belastungsintensität verwendet werden [Heck et al. (1985)].

β-Endorphin-IRM

Bei aeroben Belastungen wird β-Endorphin-IRM erst nach einer Belastungsdauer von ca. 60 Minuten im Blutplasma gefunden [Schwarz und Kindermann (1990); Heitkamp et al. (1993)]. Im anaeroben Bereich kann bei einer maximalen Ausbelastung schon nach 10-30 Sekunden β-Endorphin-IRM nachgewiesen werden [Petraglia et al. (1988); Schwarz und Kindermann (1990)].

Maximale β-Endorphin-IRM-Plasmakonzentrationen wurden unabhängig von der Belastungsart in den ersten fünf Minuten nach Ende der Belastung gefunden [Langenfeld et al. (1987); Schwarz und Kindermann (1990); Goldfarb et al. (1991)], während nach weiteren 10 Minuten, je nach Intensität und Dauer der Belastung, ein signifikanter Abfall der Peptidkonzentration zu beobachten ist [Heitkamp et al. (1993)].

Die Frage, inwieweit Training oder der Trainingszustand der Probanden Einfluss auf die Plasmakonzentration von β-Endorphin-IRM haben, wird in der Literatur sehr widersprüchlich diskutiert. Wurden trainierte Probanden mit untrainierten Probanden verglichen, ergaben sich kontroverse Befunde:

Im direkten Anschluss an eine Belastung zeigten sich bei trainierten Probanden sowohl erhöhte [Farrel et al. (1987); Moughin et al. (1987)], unveränderte [Goldfarb et al. (1991); Howlett et al. (1984)], als auch verminderte β-Endorphin-IRM-Konzentrationen [Kramer et al. (1989)]. Ebenso kontrovers sind die Studienergebnisse bezüglich der Fragestellung, ob die Ruhewerte der Fragmentkonzentrationen bei trainierten Probanden höher [Lobstein et al. (1989), (1991)] oder im Vergleich zu untrainierten Probanden gleich sind [Pierce et al. (1993)].

ACTH

Auch die ACTH-Plasmakonzentration steigt unter Belastung an. Es reichen jedoch schon deutlich geringere Belastungsintensitäten als bei β -Endorphin aus, um eine gesteigerte Freisetzung hervorzurufen. Es zeigt sich, dass β -Endorphin und ACTH nach Belastung in teils unterschiedlichen, teils aequimolaren Konzentrationen im Plasma vorliegen [Oleshansky et al. (1990); Heitkamp et al. (1993), (1996); Elias et al. (1989)]. Ob Training einen Effekt auf die ACTH-Konzentrationen nach der Belastung oder in Ruhe hat, wird ebenso wie bei β -Endorphin-IRM kontrovers diskutiert [Chennaoui et al. (2002); de Diego Acosta et al. (2001); Gomez-Merino et al. (2002); Castellani et al. (2002)]. Zuckermann-Levin et al. (2001) weisen nach, dass ACTH für die Leistungsfähigkeit des Körpers eine essentielle Bedeutung hat.

N-Acetyl- β -Endorphin-IRM

Für Nac-End-IRM liegt zur Zeit nur eine Studie vor, in der dieses POMC-Fragment unter physischen Stressbedingungen nachgewiesen wurde [Young et al. (1993)]. In dieser Studie wurden Ratten zum Schwimmen über 30 Minuten gezwungen. Hierbei konnte ein Anstieg des Nac-End-IRM im Plasma gezeigt werden.

β -MSH-IRM

Zur Zeit liegen keine Studien vor, die β -MSH-IRM im menschlichen Plasma unter physischer Belastung nachweisen.

1.5. POMC-Fragmente bei psychischer Belastung

Eine Vielzahl an Studien weist darauf hin, dass POMC-Fragmente auch bei einer rein psychischen Belastung freigesetzt werden. So sind beispielsweise erhöhte β -Endorphin-IRM-Plasmakonzentrationen beim Bungee-Springen [Hennig et al. (1994)] oder beim Ski-Springen vor und nach dem Sprung [Schulz et al. (2003)] gemessen worden. Ebenso können bei psychischer Belastung erhöhte ACTH-Plasmakonzentrationen nachgewiesen werden. So z.B. bei Probanden, die eine öffentliche Rede halten sollen [al'Absi et al. (2000)]. Es zeigt sich jedoch, dass der Konzentrationsanstieg im Plasma von individuellen Faktoren der Probanden abhängig ist [Singh et al. (1999)].

Über die Freisetzung von N-Acetyl- β -Endorphin-IRM und β -MSH-IRM unter psychischer Belastung liegen derzeit keine Studien vor.

1.6. Nachweisverfahren der POMC-Fragmente

1.6.1. ACTH

Der Nachweis von ACTH im Plasma der Probanden erfolgte im Zentrum für Klinische Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Verwendung eines Two-Site Chemilumineszensassays (Fa. Nichols-Diagnostics, San Juan Capistrano, U.S.A).

1.6.2. β -End-IRM, Nac-End-IRM, β -MSH-IRM, β -End (1-31)

Zum Nachweis von POMC-Fragmenten standen verschiedene Radioimmunoassays (RIA) zur Verfügung.

Fluid Phase-One Site Radioimmunoassay

Bei diesem Verfahren konkurriert eine konstante Menge an radioaktiv markiertem Antigen mit einer variablen Menge an nicht markiertem Antigen (Probandenprobe) um eine konstante Menge an Antikörperbindungsstellen. Je höher die Konzentration an nicht markiertem Antigen in den Proben desto geringer ist die Menge an markiertem Antigen, die von den Antikörpern gebunden wird. Über die Messung der gebundenen Radioaktivität in den Inkubationsansätzen kann auf die nicht markierte Antigenmenge - in diesem Fall die Menge der POMC-Derivate - zurückgeschlossen werden. Dieses Verfahren ermöglicht unter anderem den quantitativen Nachweis von β _H-Endorphin-IRM, β -MSH-IRM und Nac-End-IRM.

Fluid Phase-Two Site Radioimmunoassay

In diesem Verfahren wird das zu messende Peptid durch zwei verschiedene Antikörper – ein radioaktiv markierter und ein nicht markierter Antikörper - an zwei definierten Epitopen gebunden. Durch Hinzufügen von Antiserum gegen den nicht markierten Antikörper werden die Antikörper-Antigen-Komplexe, d.h. die in diesem Komplex vorhandene Radioaktivität, präzipitiert. Die Messung der Radioaktivität der Präzipitate gibt Aufschluss über die Peptidkonzentration. Dieses Verfahren ermöglicht den quantitativen Nachweis von β _H-Endorphin (1-31).

Auswertung der Radioimmunoassays

In beiden Verfahren wird Radioaktivität gemessen. Um diesen Werten eine Peptidkonzentration zuzuordnen, werden so genannte „Standardproben“ in den Assays mitbestimmt. Diese Standardproben enthalten definierte Konzentrationen des zu messenden

Peptides. Über einen Vergleich der Radioaktivität aus den Probandenproben mit der Radioaktivität aus den Standardproben können somit die Konzentrationen der Probandenproben ermittelt werden.

2. Aufgabenstellung

Zahlreiche Studien untersuchten den Einfluss physischer und psychischer Belastung auf die Freisetzung einzelner POMC-Fragmente. Das Hauptaugenmerk galt dabei dem ACTH und dem so genannten „ β -Endorphin“. Weiteren POMC-Fragmenten wie dem β -MSH oder N-Acetyl- β -Endorphin wurde dabei wohl auch aufgrund fehlender Nachweisverfahren nur geringe Beachtung geschenkt. Ein Hauptproblem der bisher durchgeführten Studien war dabei der Einsatz verschiedener, unspezifischer Nachweisverfahren, die insbesondere bei dem Nachweis von „ β -Endorphin“ bis zu 10 verschiedene β -Endorphin-Derivate und weitere POMC-Fragmente wie zum Beispiel das β -LPH erfassen. Berichtet wurde aber in den meisten Fällen nur über „ β -Endorphin“.

Ein weiteres Problem der vorliegenden Studien bestand vor allem in der mangelhaften Information über den Einfluss von intensivem körperlichem Training unter Berücksichtigung saisonaler Einflüsse auf die Freisetzung einzelner POMC-Fragmente bei physischer Belastung.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von intensivem körperlichem Training auf die Freisetzung der POMC-Fragmente ACTH, β -Endorphin-IRM, β_H -Endorphin (1-31), N-Acetyl- β -Endorphin-IRM und β -MSH-IRM unter Ausschluss saisonaler Einflussfaktoren zu erfassen. In den bereits publizierten Studien von Schulz et al. (2000) waren weder N-acetyl- β_H -Endorphin-IRM und β -MSH-IRM noch der Einfluss saisonaler Faktoren am trainierten im Vergleich zu untrainierten Versuchspersonen untersucht worden.

Mittels der in dieser Studie eingesetzten Nachweisverfahren zur Bestimmung von β -Endorphin-IRM, β_H -Endorphin (1-31), N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM und β -MSH-IRM sollte weiterhin die stressspezifische Freisetzung der nachgewiesenen POMC-Fragmente infolge Veränderung der Belastungsdauer und -intensität sowie infolge einer psychischen Belastungssituation bei konstantem Probandenkollektiv geprüft werden, um interindividuelle und intraindividuelle Unterschiede in Hinblick auf die Freisetzung der einzelnen POMC-Fragmente bei den einzelnen Stimuli aufzeigen zu können.

Ergänzend hierzu sollten eventuelle Störfaktoren der eingesetzten Nachweissysteme, insbesondere hinsichtlich der Auswertung der Befunde festgestellt und, soweit möglich, eine Problemlösung gefunden werden.

3. Material

3.1. Chemikalien, Reagenzien, Testsubstanzen

Äthanol, vergällt	Merck, Darmstadt
Aktivkohle	Merck, Darmstadt
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma, München
Antikörper 3 - E 7	Gramsch Laboratories, München
Chloramin T	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Freund'sches Adjuvans, komplett	Behring, Marburg
Freund'sches Adjuvans, inkomplett	Behring, Marburg

Gelatine	Merck, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Goat-Anti-Rabbit-Immungl. G	Peninsula, Heidelberg
Harnstoff	Merck, Darmstadt
KCL	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt

NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
Na-I ¹²⁵	Amersham, Braunschweig
Normal Rabbit Serum	Peninsula, Heidelberg

β-Endorphin-(1-31) _{human}	Peninsula, Heidelberg
N-Acetyl-β-Endorphin-(1-31) _{human}	Peninsula, Heidelberg
β-MSH _{human}	Peninsula, Heidelberg

1-Propanol	Merck, Darmstadt
Thiomersal	Merck, Darmstadt
Thyreoglobulin, porcin	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Sigma, München

3.2. Pufferlösungen

Puffer C:	0,02 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4
	0,15 M NaCl
	0,1 % Gelatine
	0,01 % BSA (Albumin aus Rinderserum)
	0,01 % Thiomersal
Puffer D:	Puffer C
	0,01 % Triton X-100

3.3. Geräte und Zubehör

Monovetten	Kabe, Nümbrecht-Elsenroth
Einmalkanülen	Braun, Melsungen
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Gammazähler	1282 Compugamma CS, LKB Wallac, Turku, Finnland
Glasmaterialien	Schott, Mainz
Heizplatte MR 2002	Heidolph, Kerkheim
Kunststoff-Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Lyophilisator GT 02	Leybold Heraeus, Köln
Magnetrührer	Janke und Kunkel, Staufen
pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Pipetten, verstellbar	Abimed, Düsseldorf
Pipettenspitzen	Ratiolab, Dreieich
Pulsuhr	Protrainer, Fa. Polar Elektro, Groß-Gerau, Deutschland
Reaktionsröhrchen (Polypropylen)	Sarstedt, Nümbrecht
Ruderergometer, Concept II	Concept II, Hamburg
Vortex-Rührer	Heidolph, Kerkheim
Kühlzentrifuge SM 24 /SS 34	Du Pont Company, Newton, Connecticut, USA
Kühlzentrifuge T 16	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge EBA 3S,	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge 5413	Eppendorf, Hamburg

3.4. Software

Excel 98 und XP	Microsoft Corporation, USA
Laktat 4.5	C.T. Hille Sportsoftware, Gerolstein
Origin 3.5 und 5.0	Microcal, Northhampton, USA
Power-Point XP	Microsoft Corporation, USA
SPSS 10	SPSS Inc. Chicago, USA
Word 98 und XP	Microsoft Corporation, USA

3.5. Statistik - Beratung

Institut für Medizinische Informatik des Klinikums der Justus-Liebig-Universität, Giessen
unter Leitung von R.-H. Bödeker.

4. Methoden

4.1. Versuchsaufbau der Stresssituationen

4.1.1. Probanden

An der Untersuchung nahmen männliche Probanden im Alter zwischen 16 und 33 Jahren teil. Alle Teilnehmer, bzw. deren Eltern wurden über den Ablauf, das Ziel sowie die Risiken und möglichen Komplikationen der Studie aufgeklärt. Die Teilnahme war freiwillig und erfolgte nach schriftlicher Zustimmung. Alle Probanden waren zum Zeitpunkt der Studie gesund und frei von jeglicher Medikation.

Ruderer

Alle sechs Probanden (Alter: 25 ± 8 Jahre; Größe: 186 ± 9 cm; Gewicht: 78 ± 4 kg (mean \pm sd)) waren Hochleistungsruderer der Gießener Rudergesellschaft von 1877, mit einem wöchentlichen Trainingsaufwand von > 20 h. Alle Ruderer nahmen zum Zeitpunkt der Untersuchung erfolgreich an internationalen Wettkämpfen bis hin zu Weltmeisterschaften teil.

Studenten

Das Kollektiv bestand aus 11 Studenten (Alter: 24 ± 4 Jahre; Größe: 185 ± 11 cm; Gewicht: 75 ± 14 kg (mean \pm sd)) der Justus-Liebig-Universität Gießen ohne regelmäßiges körperliches Training (sportliche Aktivitäten < 3 h / Woche). Eine Mindestleistungsfähigkeit von 50 Watt bei einem Laktatwert im Plasma von < 2 mmol/l stellte die Grundvoraussetzung für die Teilnahme an der Untersuchung dar. Diese wurde für jeden Probanden über einen Laktatstufentest ermittelt (siehe 4.1.2.2.).

4.1.2. Belastungssituationen

Die Probanden erschienen zu den Belastungsversuchen in einem ausgeruhten Zustand. Waren die Probanden in den vorherigen 24 h außergewöhnlichen körperlichen Belastungen oder psychischen Stresssituationen ausgesetzt, wurde die Testreihe verschoben. Zum Ausschluss zirkadianer Einflüsse auf die Freisetzung der untersuchten Parameter erfolgten die Ergometerbelastungen der einzelnen Probanden stets zur gleichen Tageszeit. Die Untersuchungen wurden zwischen 16:00 Uhr und 20:00 Uhr durchgeführt. Ausnahme war die Untersuchung der Studenten vor und nach einer Prüfungssituation, hier fanden die Abnahmen zwischen 9:30 Uhr und 12:00 Uhr statt.

4.1.2.1. Zeitlicher Verlauf

Die Studie erstreckte sich über 12 Monate, von Oktober 1998 bis September 1999, mit je einer Belastung pro Monat. Ausnahme hierzu stellt Monat Mai mit zwei Belastungen dar. In den Monaten März und August fanden keine Belastungen statt. Die psychische Belastung (Semesterabschlussprüfung) wurde bei 5 Studenten gesondert im Juli durchgeführt. (Zwei dieser Studenten erreichten das geforderte Prüfungsziel nicht und wurden erneut bei einer mündlichen Nachprüfung im September untersucht.)

Laktatstufentest	Monat 0:	Oktober
Standardbelastung	Monate 1 bis 6:	
	Monat 1:	November
	Monat 2:	Dezember
	Monat 3:	Januar
	Monat 4:	Februar
	Monat 5:	April
	Monat 6:	Mai
Belastung A	Monat 6:	Mai
Belastung B	Monat 7:	Juni
Psychische Belastung	Monat 8:	Juli
(Nachprüfung	Monat 11:	September)

4.1.2.2. Laktatstufentest

Als Basis der folgenden Belastungssituationen absolvierten alle Probanden im Monat 0 einen Laktatstufentest, so dass die spätere Versuchsbelastung für jeden Probanden entsprechend dem individuellen Leistungsniveau festgelegt werden konnte. Dies ermöglichte trotz unterschiedlicher individueller Leistungsfähigkeit den Vergleich der Probanden miteinander.

Versuchsbeschreibung des Laktatstufentestes

- Eingangsbelastung: Studenten 50 Watt / 4 min -- Ruderer 100 Watt / 4 min
- Steigerung um 50 Watt alle 4 Minuten bis zur Erschöpfung
- Bestimmung der Laktatwerte und Herzfrequenzen am Ende jeder Belastungsstufe

4.2.3. Bestimmung von Laktat

Die Messung von Laktat aus Natrium-Fluoridplasma erfolgte im Akutlabor des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen mit Hilfe einer Ionen-Exclusions-Chromatographie (Kodak Ektachem 500, Eastman Kodak Company, Rochester / New York, USA).

Normalwert: < 1,5 mmol/l

4.3 Gewinnung / Aufbereitung der Blutproben

Die venösen Blutentnahmen erfolgten standardisiert (Stauung re./li. Arm für 10 sec) aus einer Cubitalvene der Probanden in Monovetten. Zur Bestimmung der POMC-Fragmente wurden EDTA-Monovetten eingesetzt, für Laktat Na-Fluorid-Monovetten. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten bei einer Temperatur von 0°C bis 4°C.

Plasmagewinnung

Das entnommene Blut wurde direkt im Anschluss an die Abnahme 15 min bei 1000 g zentrifugiert. Das so gewonnene Natrium-Fluoridplasma wurde abpipettiert und bei -20 °C gelagert. Das EDTA-Plasma wurde mit 1-normaler HCL (100 µl/ml Plasma) angesäuert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.4. Methoden zur Bestimmung der POMC-Derivate

- POMC-Fragmente:
1. ACTH (1-39)
 2. β_H -Endorphin-IRM
 3. β_H -Endorphin (1-31)
 4. N-Acetyl- β -Endorphin-IRM
 5. β -MSH-IRM

4.4.1. Methode zur Bestimmung von ACTH (1-39)

Die Plasmakonzentration von ACTH wurde im Zentrum für Klinische Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen durch ein Two-Site Chemilumineszenzassay (Fa. Nichols-Diagnostics, San Juan Capistrano, USA) aus EDTA-Plasma bestimmt.

Normalwerte:	8 Uhr	< 11 pmol/l
	17 Uhr	< 4,5 pmol/l
	24 Uhr	< 2,2 pmol/l

Charakteristika des Chemilumineszenzassays:

Nachweisgrenze (detection limit):	0,22 pmol/l
Präzision (intra-assay coefficient of variation):	3,0 % - 3,2 %
Reproduzierbarkeit (inter-assay coefficient of variation):	6,8 % - 7,8 %
Spezifität (cross-reactivity):	β -Endorphin < 0,001 %
	β -LPH < 0,001 %
	β -MSH < 0,001 %

4.4.2. Methoden zur Bestimmung von β _H-Endorphin-IRM, β _H-Endorphin (1-31), N-Acetyl- β -Endorphin-IRM, β -MSH-IRM

Die Bestimmung der POMC-Fragmente β _H-Endorphin-IRM, β _H-Endorphin (1-31), N-Acetyl- β _H-Endorphin-IRM, β -MSH-IRM erfolgte über ein mehrstufiges Verfahren:

- Plasmaextraktion
- Lyophilisation
- Immunometrisches Nachweisverfahren
- Auswertung

4.4.2.1. Plasmaextraktion

Durch diesen Arbeitsschritt sollten zum einen Störfaktoren des RIA-Verfahrens eliminiert werden, zum anderen wird hierbei eine 10-fache Konzentrierung der gesuchten Peptide im Plasma erreicht: Das Ausgangsvolumen von 5 ml Plasma wurde auf 500 μ l Plasmaextrakt reduziert. Vor der Extraktion wurden die mit 1-normaler HCL angesäuerten Plasmaproben aufgetaut, 10 min bei 20.000 g zentrifugiert und 5 ml dieser Plasmaüberstände in die Plasmaextraktion eingebracht.

Alle verwendeten Spül- bzw. Elutionslösungen sowie die Plasmaüberstände wurden im gekühlten Zustand mit einer Temperatur von 0°C bis 4°C in die Flüssigkeitsbehälter der Extraktionsanlage pipettiert. Durch ein Vakuum, erzeugt durch eine Wasserstrahlpumpe, wurden die Flüssigkeiten mit einer Flussrate von ca. 1 ml/min durch Octadecasil-Kartuschen (Sep Pak) gesaugt. Diese wurden durch einen Eismantel gekühlt und nach 9 Durchgängen erneuert. Das peptidenthaltende Eluat wurde in Polypropylen-Reaktionsgefäßen aufgefangen [Wiedemann und Teschemacher (1986)].

Durchführung der Extraktion

1. Aktivierung der Kartuschen durch Aufgabe von:
 - 1.1. 5 ml Methanol
 - 1.2. 5 ml 6-molaren Harnstoff
 - 1.3. 10 ml Aqua bidest.
2. Aufgabe der angesäuerten Plasmaüberstände (5 ml)
3. Waschen der Kartuschen durch Aufgabe von :
 - 3.1. 10 ml Aqua bidest.
 - 3.2. 10 ml 4 %iger Essigsäure

Einbringen der Auffangröhrchen

4. Elution der auf den Kartuschen retinierten POMC-Derivate durch Aufgabe von :
 - 5 ml eines 1-Propanol / Essigsäuregemisches (96/4; V/V)

Entfernen der Auffangröhrchen

5. Spülung der Kartuschen durch Aufgabe von :
 - 5.1. 5 ml des 1-Propanol-Essigsäuregemisches
 - 5.2. 10 ml 4 %iger Essigsäure
 - 5.3. 10 ml Aqua bidest.
 - 5.4. 5 ml 6-molaren Harnstoff

Zwecks Standardisierung des Verfahrens wurden nicht angesäuerte Plasmaüberstände ohne Verwendung saurer Lösungen ebenfalls extrahiert und damit von POMC-Fragmenten „gereinigt“; sie wurden als „Plasmafiltrate“ bezeichnet. Diese „Plasmafiltrate“ wurden, ebenso wie die Plasmaproben der Versuchspersonen, angesäuert und ohne (Leer-Extrakte) bzw. mit POMC-Derivaten versetzt (Standard-Extrakte), extrahiert und in die RIAs (4.4.2.4. und 4.4.2.6.) eingeschleust.

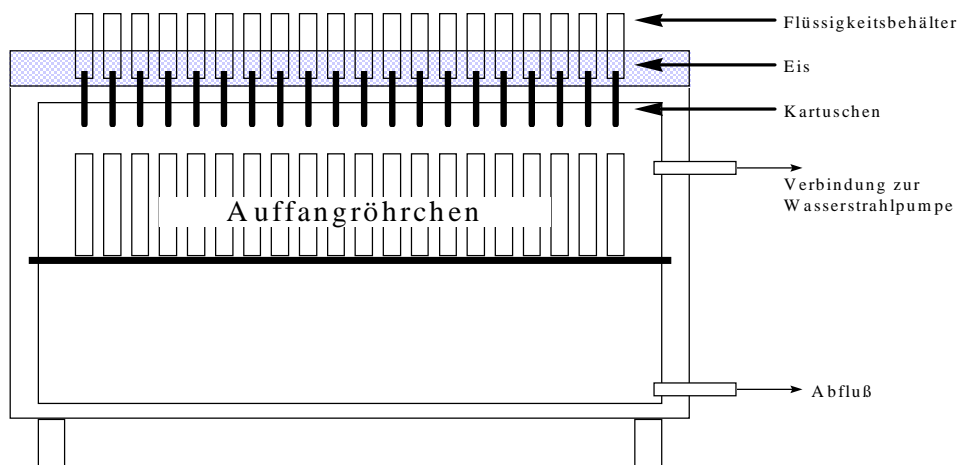


Abb. 4.4-1 Darstellung der Extraktionsanlage (Längsschnitt) [Schulz (2003)].

4.4.2.2. Lyophilisation

Die organischen Bestandteile der Eluate wurden in einer Vakuumzentrifuge (Speed-Vac-Concentrator) evakuiert und die verbleibende wässrige Phase wurde nach Zugabe von 500 µl Aqua bidest. lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 500 µl Puffer C gelöst, in 100 µl Portionen aliquotiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Das Produkt dieser Arbeitsschritte wird im Folgenden als „Plasmaextrakt“ bezeichnet.

4.4.2.3. Immunometrische Nachweisverfahren

Zum Nachweis der POMC-Fragmente β_{H} -Endorphin-IRM, β_{H} -Endorphin (1-31), N-Acetyl- β -Endorphin-IRM, β -MSH-IRM wurden zwei verschiedene Nachweisverfahren, die auf dem Prinzip des Radioimmunoassay (RIA) basieren, eingesetzt.

4.4.2.4. Fluid Phase-One Site Radioimmunoassays

Der Fluid Phase-One Site Radioimmunoassay wurde zur quantitativen Bestimmung von β_{H} -Endorphin-IRM, N-Acetyl- β -Endorphin-IRM und β -MSH-IRM eingesetzt.

Hierbei handelt es sich um einen Kompetitions-Test [Heinzmann et al. (1997)]. Der Test basiert auf der Konkurrenz einer definierten Menge radioaktiv markierten Antigens mit einer variablen Menge nicht markierten Antigens um die Bindungsstelle einer begrenzten Anzahl

an Antikörpern. Je höher die Konzentration an nicht markiertem Antigen ist, desto höher ist die Verdrängung des markierten Antigens vom Antikörper und umso geringer ist die Konzentration des Antikörper-gebundenen, markierten Antigens im Inkubationsansatz. Nach dem Entfernen des nicht gebundenen und nicht markierten Antigens liegen die beiden gebundenen Antigenformen in einem bestimmten Verhältnis zueinander im Inkubat vor.

Durch die Messung der verbliebenen Radioaktivität im Inkubationsansatz kann die Konzentration an markiertem Antigen und somit – nach Eichung des Verfahrens über Zusatz definierter Mengen an nicht markiertem Antigen - die Konzentration des nicht markierten Antigens in einer Probe bestimmt werden.

Assayansatz

Nicht markiertes Antigen:

Hierbei handelt es sich um das zu bestimmende POMC-Derivat in den Proben.

Radioaktiv markiertes Antigen (Tracer):

Mit J-125 (γ -Strahler, Halbwertszeit 60 Tage) markiertes POMC-Derivat. Hergestellt nach den Methoden von Hunter et al. (1962) mit Modifikationen nach Wiedemann und Teschemacher (1986).

Antikörper (Antiserum):

Kaninchenserum, hergestellt nach der Methode von Weber et al. (1982) mit Modifikationen nach Wiedemann und Teschemacher (1986).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Gewinnung von verschiedenen Antiseren gegen Epitope der POMC-Fragmente CLIP, β -Endorphin (1-17) und NT-Fragment versucht. Die Immunisierung von 12 Kaninchen über einen Zeitraum von ca. 8 Monaten erbrachte jedoch keinen ausreichenden AK-Titer, so dass kein neuer Assay zum Nachweis der Peptide aufgebaut werden konnte.

Pufferlösung:

Bei den Inkubationsansätzen wurden RIA Puffer C und Puffer D nach Guillemin et al. (1977) verwendet.

Ct-Wert (Counts total):

Doppelwertbestimmung; maximal mögliche Gesamtradioaktivität im Inkubationsansatz.

BI-Wert (Blank-Wert, Leerwert):

Doppelwertbestimmung; Der BI-Wert weist die unspezifische Radioaktivität im Inkubat nach, die nicht auf eine Antigen-Antikörper-Bindungsreaktion zurückzuführen ist. Sein Mittelwert wurde von allen anderen Werten abgezogen. Die BI-Werte wurden mittels Einsatz von Leer-Extrakten erstellt.

B0-Wert (Nullstandard):

Die Höhe des B0-Wertes wurde aus dem Mittelwert von 8 (± 2) B0-Ansätzen bestimmt. Dieser Wert zeigt bei Abzug des BI-Wertes die Radioaktivität, die bei Abwesenheit eines Verdrängers (nicht markiertes Antigen) vorliegt. Sie geht auf die spezifische Bindung des Tracers (markiertes Antigen) an das Antiserum zurück.

Die B0-Ansätze wurden mittels Einsatz von Leer-Extrakten erstellt.

St-Wert (Standardwert):

Doppelwertbestimmung; Dieser Wert gibt die Radioaktivität an, die im Inkubat bei dem Vorliegen abgestufter Konzentrationen an nicht markiertem Antigen in den Standard-Extrakten messbar ist. Die Standard-Extrakte wurden aus Plasmafiltrat gewonnen, welches mit den entsprechenden Peptidkonzentrationen (1, 3, 10, 33, 100, 333 und 1000 pmol/l) versetzt wurde.

Probe:

Die Bestimmung der POMC-Derivate in einer Blutabnahme wurde durch eine Doppelmessung von 2 x 100 µl Plasmaextrakt durchgeführt.

Inkubationsansätze:

	Ct-Wert	BI-Wert	B0-Wert	St-Wert	Probe
Puffer C	500 µl	150 µl	100µl	100µl	100µl
Puffer D	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Leer-Extrakt in Puffer C	-	50 µl	50 µl	-	-
Standard-Extrakt in Puffer C	-	-	-	50 µl	-
Proben-Extrakt in Puffer C	-	-	-	-	50 µl
Antikörper in Puffer C	-	-	50 µl	50 µl	50 µl
Tracer in Puffer D	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

Tab. 4.4-2 Inkubationsansätze des Fluid Phase-One Site Radioimmunoassays.

Alle Inkubationsansätze wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei einer Temperatur von 4°C erstellt. Nach Einpipettieren aller Komponenten wurden die Ansätze 20 sec geschüttelt und 24 h bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden 300 µl Kohlesuspension (Puffer C mit 1 % Aktivkohle und 0,5 % BSA) auf alle Ansätze mit Ausnahme der Ct-Werte aufgebracht. Die Kohle bindet die freien, nicht an Antikörper gebundenen Peptide, so dass nach 15 minütiger Inkubation und einem Zentrifugationsprozess von 4 min bei 8000 g eine Trennung der festen Phase von der flüssigen Phase und somit auch die Trennung der freien von den gebunden Peptiden erreicht wurde. 450 µl des Überstandes (dieser enthält nur noch an Antikörper gebundene POMC-Derivate) wurden abpipettiert und die darin enthaltene Radioaktivität wurde über 1 min im Gammazähler gemessen.

4.4.2.5. Charakteristika der Fluid Phase-One Site Radioimmunoassays

β_H-Endorphin-IRM [Harbach et al. (2000)]

Nachweisgrenze (detection limit):	5,8 pmol/l
Präzision (intra-assay coefficient of variation):	6,3 %
Reproduzierbarkeit (inter-assay coefficient of variation):	6,8 %
Spezifität (cross-reactivity):	α-Endorphin < 0,01 % β-Endorphin-(27-31) < 0,01 % β-LPH 54 %

N-Acetyl-β-Endorphin-IRM [Schulz (2003)]

Nachweisgrenze (detection limit):	3,5 pmol/l
Präzision (intra-assay coefficient of variation):	3,6 %
Reproduzierbarkeit (inter-assay coefficient of variation):	4,3 %
Spezifität (cross-reactivity):	β-Endorphin < 0,01 % (nur acetylierte Formen werden erfasst)

β-MSH-IRM [Matejec (2002)]

Nachweisgrenze (detection limit):	7,94 pmol/l
Präzision (intra-assay coefficient of variation):	9,62 %
Reproduzierbarkeit (inter-assay coefficient of variation):	10,2 %
Spezifität (cross-reactivity):	β-LPH 32,3 % α-MSH 0,138 % γ ₂ -MSH < 0,03 %

4.4.2.6. Fluid Phase-Two Site Immunopräzipitations-Radioimmunoassay

Dieses Verfahren wurde zur quantitativen Bestimmung von authentischem β_{H} -Endorphin (1-31) eingesetzt. Es ist in der Publikation von Harbach et al. (2000) im Detail beschrieben.

Bei diesem Verfahren werden zwei Antikörper von zwei verschiedenen Spezies (Maus/Kaninchen) eingesetzt, die gegen zwei Epitope des POMC-Fragmentes gerichtet sind. Die Antikörper greifen coaxial am C-Terminus und am N-Terminus von β_{H} -Endorphin (1-31) an. Am C-Terminus greifen die Antikörper eines polyklonalen Kaninchensерums an, am N-Terminus ein monoklonaler Mausantikörper [Gramsch et al. (1983)], welcher radioaktiv markiert ist. Somit handelt es sich bei diesem Assay um ein nicht-kompetitives Verfahren. Bei Vorhandensein des Antigens (β_{H} -Endorphin (1-31)) bilden sich „Antikörper-Antigen-Antikörper“-Komplexe. Diese werden durch Hinzufügen eines gegen das F_c -Stück der Kaninchenantikörper gerichteten Ziegenantisерums (GARGG) zur Präzipitation (Ausfällung) gebracht.

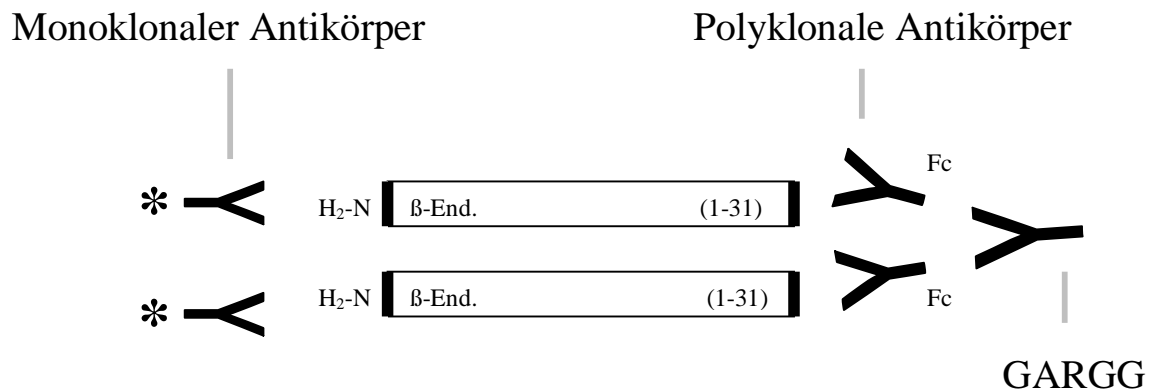


Abb. 4.4-3 Bindungsstellen der verschiedenen Antikörper bei einem Fluid Phase-Two Site Immunopräzipitations-Radioimmunoassay zum Nachweis von authentischem β -Endorphin (1-31) (* radioaktive Markierung mit ^{125}I)

Nach dem Trennen der festen Phase (Antigen-Antikörper-Komplexe) von der flüssigen Phase kann nun die Menge des Antigens durch Messung der Radioaktivität im Immunopräzipitat bestimmt werden.

Assayansatz

Antigen:

Hierbei handelt es sich um das zu bestimmende POMC-Derivat in den Proben (Doppelwertbestimmung).

Antikörper gegen den C-Terminus:

Kaninchenserum (Code 11P), gewonnen nach der Methode von Weber et al. (1982) mit Modifikationen nach Wiedemann und Teschemacher (1986), über eine PAS-Säule gereinigt.

Radioaktiv markierte Antikörper gegen den N-Terminus (Tracer):

Es fand ein (^{125}I) markierter monoklonaler Mausantikörper (Code 3E7) Verwendung. Die Jodierung erfolgte nach der Chloramin T-Methode [Hunter et al. (1962)] mit Modifikationen nach Wiedemann und Teschemacher (1986).

Ziegenantiserum gegen das F_c-Stück des Kaninchenantikörpers:

GARGG (Goat-Anti-Rabbit-Immunglobulin G)

Ct-Wert, St-Wert, Pufferlösung:

(siehe 4.4.2.4.)

Z0-Wert (Nullstandard):

Dieser Wert entspricht dem B0-Wert (s.o.) jedoch ohne Abzug eines BI-Wertes (dieser existiert beim Two-Site RIA nicht).

Inkubationsansätze:

	Ct-Wert	Z0-Wert	St-Wert	Probe
Puffer C	500 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Puffer D	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Leer-Extrakt in Puffer C	-	100 µl	-	-
Standard-Extrakt in Puffer C	-	-	100 µl	-
Proben-Extrakt in Puffer C	-	-	-	100 µl
C-terminaler Antikörper (10µg)in Puffer C	-	50 µl	50 µl	50 µl
N-terminaler Antikörper ((^{125}I)3E7 30000cpm) in Puffer D	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Maus IgG (Verdünnung 1:5) in Puffer C	-	10 µl	10 µl	10 µl
Thyreoglobulin (10µg) in Puffer C	-	20 µl	20 µl	20 µl
<i>Inkubation 20-24 h bei 4°C</i>				

	Ct-Wert	Z0-Wert	St-Wert	Probe
GARGG (1mg) in Puffer C	-	100 µl	100 µl	100 µl
NRS (400µg) in Puffer C	-	100 µl	100 µl	100 µl
<i>Inkubation 2 h bei 22-24°C</i>				
Puffer C	-	500 µl	500 µl	500 µl

Tab. 4.4-4 Inkubationsansätze des Fluid Phase-Two Site Immunopräzipitations RIA zum Nachweis von authentischem β_H -Endorphin (1-31).

Durchführung

Die komplette Pipettierung fand auf Eis statt. Die quantitative Zusammensetzung der Inkubationsansätze und die Reihenfolge des Pipettierschemas sind in Tab. 4.4-4 dargestellt. Dem entsprechend erfolgten zunächst die Aufgabe von Puffer C und Puffer D, sowie die Aufgabe von jeweils 100µl der Leer-, Standard-, und Proben-Extrakte für die Inkubationsansätze des Z0-Wertes, der Standardwerte und der Probenwerte. Durch die nun erfolgte Zugabe von zwei verschiedenen Antikörpern, die jeweils Epitope einerseits am N-terminus, andererseits am C-Terminus von β_H -Endorphin (1-31) aufwiesen, wurde verhindert, dass weitere β -Endorphin-Derivate erfasst wurden; nachgewiesen wurde nur authentisches β -Endorphin. Der 1.Antikörper (Epitop: C-Terminus) wurde in einer Konzentration von 10µg in 50µl Puffer C aufgegeben. Der am N-Terminus ansetzende monoclonale Mausantikörper (2.Antikörper) war zuvor nach der Chloramin T-Methode mit ^{125}I radioaktiv markiert worden und mit Puffer D so verdünnt worden, dass 20µl dieser Lösung 30000cpm enthielten (Gammazähler). Thyreoglobulin und Maus IgG wurden zwecks Senkung der Basalwerte eingesetzt. Die unspezifische Präzipitation des ^{125}I -markiertem Mausantikörper ließ sich dadurch stark verringern. Nach Zugabe aller Komponenten wurden die Ansätze für 20-24h bei 4°C inkubiert. Es folgte die Aufgabe - mit der Ausnahme des Inkubationsansatzes für die Bestimmung des CT-Wertes - von jeweils 100µl GARG (Goat-Anti-Rabbit-IgG / 1mg) und NRS (Normal Rabbit Serum / 400µg). Durch Inkubation (2h bei 4°C) mit dem dritten Antikörper (GARG) präzipitierten die 1.Antikörper-Peptid-2.Antikörper (^{125}I -markiert) – Komplexe. Im Anschluss wurden die Proben nach der Zugabe von 500 µl Puffer C für 10 min bei 8000 g zentrifugiert, wodurch die feste Phase (Immunpräzipitate) von der flüssigen Phase getrennt wurde. Im Anschluss wurden die Überstände abpipettiert und die Radioaktivität des Präzipitates im Gammazähler gemessen. Die „Ct-Kontrolle“ wurde ohne Immunpräzipitation direkt im Counter gemessen.

Da bei der Untersuchung der β_{H} -Endorphin (1-31)-Plasmakonzentrationen bei verschiedenen Assayansätzen Probleme der Auswertung auftraten, werden diese hier im Einzelnen aufgeführt. Auf Grund der großen Probenanzahl wurden die β_{H} -Endorphin (1-31)-Plasmakonzentrationen in drei Assays aufgeteilt:

Assay 1:	Studenten	-	Monat 1-3
	Ruderer	-	Monat 1-2
Assay 2:	Studenten	-	Monat 4-6
	Ruderer	-	Monat 3-6
Assay 3:	Studenten	-	Belastung A + B / Psychische Belastung
	Ruderer	-	Belastung A + B

4.4.2.7 Charakteristika des Fluid Phase-Two Site Immunopräzipitations-Radioimmunoassays [Harbach et al. (2000)]

Nachweisgrenze (detection limit):	5,5 pmol/l
Präzision (intra-assay coefficient of variation):	3,72 %
Reproduzierbarkeit (inter-assay coefficient of variation):	3,81 %
Spezifität (cross-reactivity):	β -Endorphin-(1-27) < 0,01 %
	β -Endorphin-(1-26) < 0,01 %
	β -Endorphin-(1-17) < 0,01 %
	β -Endorphin-(1-16) < 0,01 %
	N-terminal-acetylierte- β -Endorphin-Derivate < 0,01 %
	β -LPH < 0,01 %

4.4.2.8. Auswertung der Radioimmunoassays

Die St-Werte stellen die Basis der Auswertung dar. Über sie ist es möglich, eine Funktion zu erstellen, die dem radioaktiven Signal der Proben eine Konzentration [pmol/l] zuordnet. Der Kurvenverlauf der Funktion ist sigmoidal, ihr Nullpunkt wird durch den Mittelwert der $8 (\pm 2)$ B0 bzw. Z0-Werte bestimmt. Die erste Standardabweichung der Nullstandard-Werte gibt die Grenze vor, ab der sich ein Wert signifikant von Null unterscheidet (Nachweisgrenze). Pro Blutabnahme wurde eine Doppelmessung (2 Proben) vorgenommen. Jede Probe wurde zuerst

über die Funktion einer Konzentration zugeordnet. Lagen beide Werte oberhalb der Nachweisgrenze, wurde ein Mittelwert \pm Standardabweichung gebildet. Lag ein Wert (oder beide Werte) der Doppelmessung unterhalb der Nachweisgrenze, wurde der Wert dieser Messung gleich Null gesetzt.

4.5. Statistik

Die statistische Auswertung der Befunde wurde nach Prüfung der Normalverteilung und unter Berücksichtigung des Freiheitsgrades mit dem T-Test nach Student durchgeführt.

Dabei kamen folgende Verfahren zur Anwendung:

1. Vergleichende Betrachtung zweier Datenreihen einer Gruppe: T-Test nach Student für verbundene Stichproben mit zweiseitiger Fragestellung.
2. Vergleichende Betrachtung zweier Datenreihen verschiedener Gruppen: T-Test nach Student für unverbundene Stichproben mit zweiseitiger Fragestellung.

Die Signifikanzniveaubestimmung unterlag folgenden Irrtumswahrscheinlichkeiten:

$p \leq 0,05$	\Rightarrow	Irrtumswahrscheinlichkeit $\leq 5 \%$
$p \leq 0,01$	\Rightarrow	Irrtumswahrscheinlichkeit $\leq 1 \%$
$p \leq 0,001$	\Rightarrow	Irrtumswahrscheinlichkeit $\leq 0,1 \%$

5. Ergebnisse

Die erhobenen Kontrollparameter und die Plasmakonzentrationen der POMC-Derivate werden im weiteren Verlauf einzeln dargestellt.

Kontrollparameter:	- Leistung
	- Herzfrequenz
	- Laktat
POMC-Fragmente:	- ACTH
	- β_{H} -Endorphin-IRM
	- β_{H} -Endorphin (1-31)
	- N-Acetyl- β_{H} -Endorphin-IRM
	- β -MSH-IRM

Alle Parameter, mit Ausnahme der Leistung, wurden jeweils vor, unmittelbar nach der Belastungssituation sowie 15 Minuten nach der Belastung erfasst.

5.1. Physische Belastung

5.1.1. Physische Belastungssituationen: Kontrollparameter

5.1.1.1. Leistung

Die von den einzelnen Probanden erbrachten Leistungen, die auf dem Display des Ruderergometers angezeigt wurden, sind in den Abbildungen 5.1-1 bis 5.1-3 dargestellt.

Standardbelastung – Monate 1 bis 6

Die Probanden hielten die vorgegebene Leistung [Watt] mit einer Abweichung von ± 8 Watt ein. Die Nummerierung der Probanden erfolgte nach ihrer erbrachten Leistung (bei 6 mmol/l Laktat) in aufsteigender Reihenfolge. Diese Anordnung wird in allen weiteren Darstellungen beibehalten.

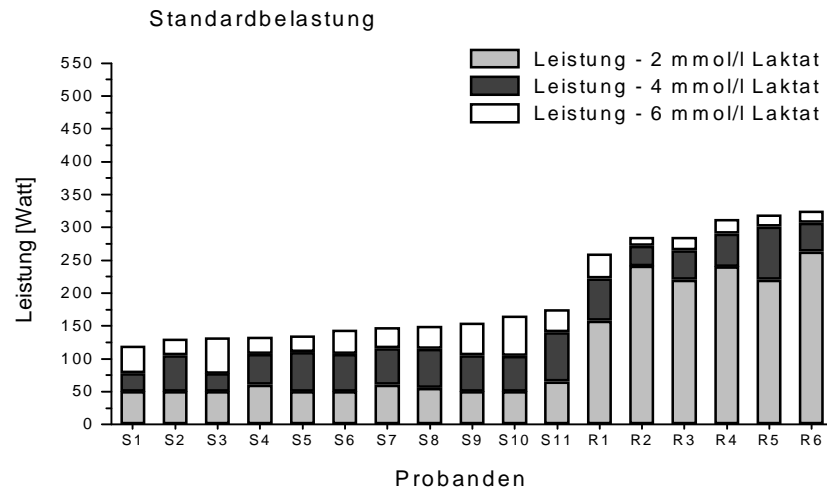


Abb. 5.1-1 Erbrachte Leistung [Watt] der Probanden bei Standardbelastung - Monate 1 bis 6.

Belastung A – Monat 6

Beim Endspurt lagen die Maximalleistungen (P_{\max}) der Studenten zwischen 245 und 379 Watt, die der Ruderer zwischen 325 und 530 Watt. Vier Studenten (S3, S6, S8, S9) erbrachten eine höhere Leistung als der schwächste Ruderer (R5). Dieser war nicht in der Lage, beim Endspurt seine Leistung im Vergleich zur Standardbelastung zu steigern. Student (S11) erbrachte die Höchstleistung in der Gruppe der Studenten mit $P_{\max} = 379$ Watt. Ruderer (R3) absolvierte seine Maximalbelastung eine Woche nach seiner errungenen Vizeweltmeisterschaft. Die höchste Leistung erbrachte Ruderer (R6) mit $P_{\max} = 530$ Watt.

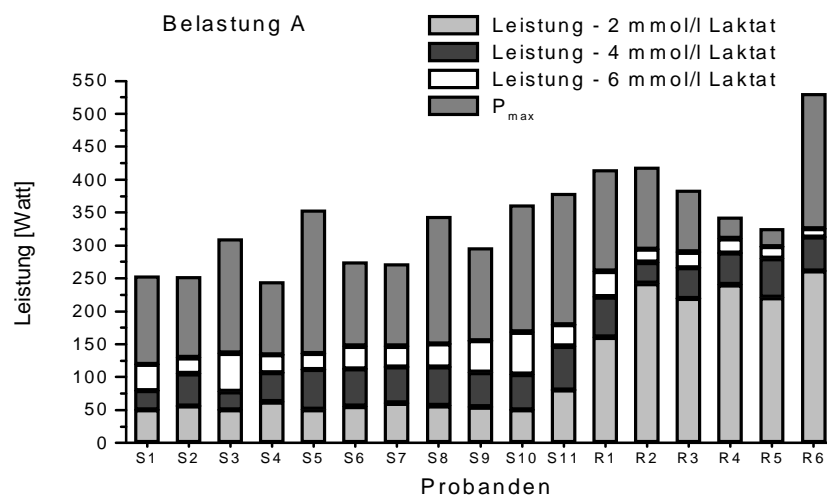


Abb. 5.1-2 Erbrachte Leistung [Watt] der Probanden bei maximaler Ausbelastung (Belastung A).

Belastung B – Monat 7

Die Aufwärmphase erstreckte sich über 8 Minuten und wurde von den Studenten mit 50 Watt \pm 15 Watt und von den Ruderern mit 100 Watt \pm 2 Watt absolviert.

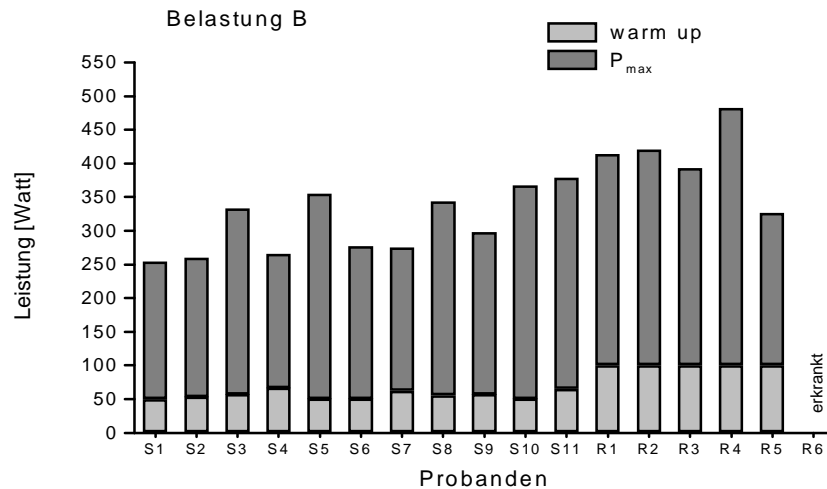


Abb. 5.1-3 Erbrachte Leistung [Watt] der Probanden bei Belastung B; 2 min P_{max}; (R6 wegen Krankheit ausgefallen).

5.1.1.2. Herzfrequenz

Die mittlere Herzfrequenz stieg in beiden Gruppen nach der Standardbelastung im Vergleich zu den Werten vor der Belastung an ($p=0,001$). Ebenso fiel sie wieder 15 Minuten nach Ende der Belastung ab ($p=0,001$).

Bei den Studenten lag die durchschnittliche Herzfrequenz nach den Belastungen A + B mit 177 ± 17 /min höher als bei den Standardbelastungen der Monate 1 bis 6 mit 149 ± 17 /min. Bei den Ruderern lag nach der Standardbelastung die Herzfrequenz bei 179 ± 15 /min (mean \pm sd).

<u>Studenten</u>	Vor Belastung	Unmittelbar nach Belastung	15 min nach Belastung
Standardbelastung (Monate 1-6)	74 ± 14	149 ± 19	87 ± 11
Belastung A	78 ± 9	183 ± 16	109 ± 13
Belastung B	78 ± 5	170 ± 18	98 ± 15
<u>Ruderer</u>	Vor Belastung	Unmittelbar nach Belastung	15 min nach Belastung
Standardbelastung (Monate 1-6)	64 ± 8	179 ± 15	84 ± 6
Belastung A	68 ± 7	199 ± 19	109 ± 17
Belastung B	67 ± 13	174 ± 23	84 ± 13

Tab. 5.1-4 Mittelwerte (\pm sd) der Herzfrequenzen [Schläge/min] der Studenten und der Ruderer bei Standardbelastung, Belastung A und Belastung B.

5.1.1.3. Laktat

Die Laktatkonzentration (mean \pm sd) im Plasma stieg in beiden Gruppen (unabhängig von der Art der Belastung) nach der Belastung an ($p=0,001$). 15 Minuten nach Ende der Belastung fiel die Plasmakonzentration ab ($p=0,001$).

<u>Studenten</u>	Vor Belastung	Unmittelbar nach Belastung	15 min nach Belastung
Standardbelastung (Monate 1-6)	1,7 ± 0,6	5,7 ± 1,4	2,3 ± 0,6
Belastung A	1,5 ± 0,5	19,6 ± 3,6	13,3 ± 4,3
Belastung B	1,6 ± 0,2	15,8 ± 3,6	9,6 ± 2,9
<u>Ruderer</u>	Vor Belastung	Unmittelbar nach Belastung	15 min nach Belastung
Standardbelastung (Monate 1-6)	1,5 ± 0,2	6,4 ± 2	2,6 ± 1,1
Belastung A	1,2 ± 0,2	17 ± 6,8	9,9 ± 5,1
Belastung B	1,2 ± 0,2	11,7 ± 5,1	5,1 ± 2,7

Tab. 5.1-5 Mittelwerte (\pm sd) der Laktatwerte [mmol/l] der Studenten und der Ruderer bei Standardbelastung, Belastung A und Belastung B.

5.1.2. Physische Belastungssituationen: POMC-Derivate

5.1.2.1. ACTH (1-39)

Beim intraindividuellen Vergleich in den Monaten 1 bis 6 (Standardbelastung) blieben die ACTH-Plasmakonzentrationen bei gleich bleibender Belastung bei allen Probanden in ihrer Höhe in einem geringen Schwankungsbereich konstant. Der interindividuelle Vergleich zwischen den Probanden zeigte, dass einige höhere ACTH-Plasmakonzentration aufwiesen als andere Probanden mit vergleichbaren Leistungen. Steigerte man die Belastung auf ein maximales (Belastung A) oder submaximales (Belastung B) Niveau, kam es zu einer Zunahme der ACTH-Freisetzung nach der Belastung. Auch hier waren Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden zu beobachten.

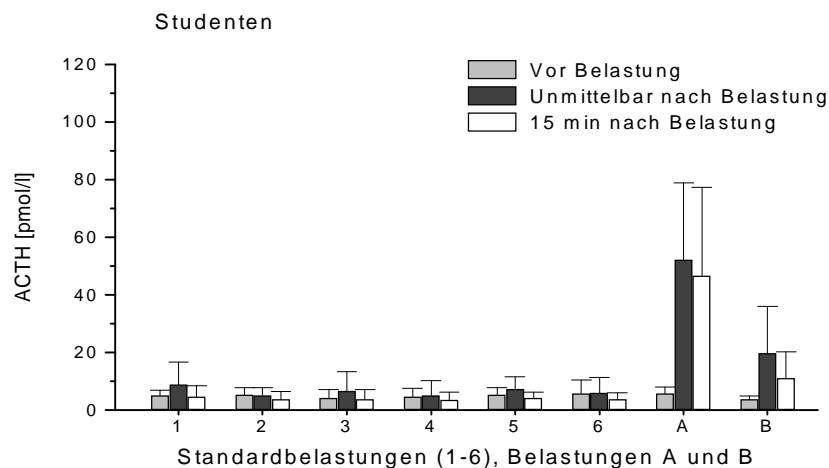


Abb. 5.1-6 Darstellung der ACTH-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Studenten vor sowie unmittelbar bzw. 15 min nach der Belastung (mean±sd).

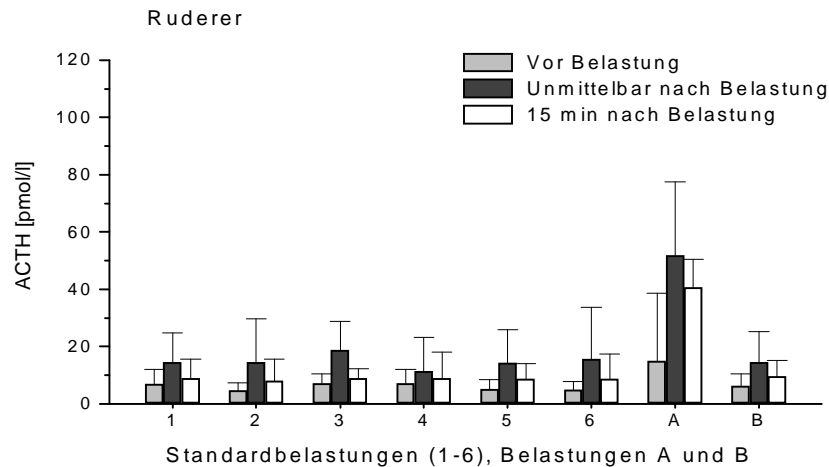


Abb. 5.1-7 Darstellung der ACTH-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Ruderer vor sowie unmittelbar bzw. 15 min nach der Belastung (mean±sd).

Zusammenfassung der ACTH-Konzentrationen bei Standardbelastung (Monate 1 bis 6)

Vor der Belastung betrug die ACTH-Konzentration der Studenten $5,6 \pm 2,6$ pmol/l. Nach der Belastung stieg die Peptidkonzentration signifikant auf $7,2 \pm 5,3$ pmol/l an ($p=0,05$) und fiel 15 min nach Belastung signifikant auf $4,3 \pm 2,7$ pmol/l ab ($p=0,001$). Vergleicht man den Wert vor der Belastung mit dem Wert 15 min nach Ende der Belastung, so zeigt sich, dass die ACTH-Konzentration unter den Ruhewert im Vorfeld der Belastung gefallen ist ($p=0,01$). Die Ruderer zeigten vergleichbare Ruhewerte von $6,9 \pm 3,0$ pmol/l. Unmittelbar nach der Belastung lag die ACTH-Plasmakonzentration bei $17,1 \pm 11,8$ pmol/l. 15 min nach Ende der Belastung war die ACTH-Konzentration auf $10,0 \pm 6,0$ pmol/l abgefallen. Der An- und Abfall ist mit $p=0,001$ signifikant (mean±sd).

Vergleich Studenten vs. Ruderer:

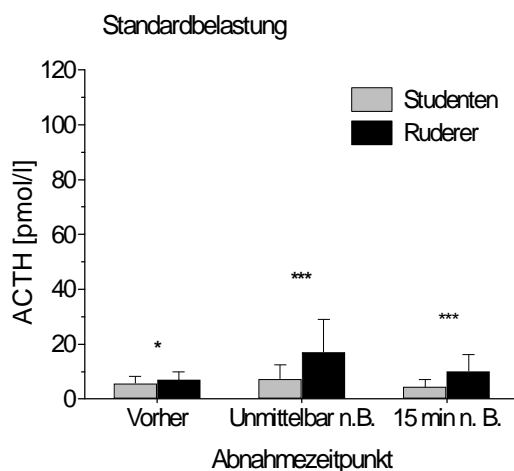


Abb. 5.1-8 Darstellung der ACTH-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Studenten vs. Ruderer vor sowie unmittelbar bzw. 15 min nach der Standardbelastung (mean±sd). (n.B.:nach Belastung)

Signifikante Unterschiede Studenten vs. Ruderer - *: $p=0,05$; ***: $p=0,001$

ACTH-Konzentrationen bei Belastung A und B

Die höchsten ACTH-Konzentrationen im Plasma konnten nach der maximalen Ausbelastung (Belastung A) nachgewiesen werden. Bei den Studenten lag die höchste Peptidkonzentration bei 116,5 pmol/l (S8), bei den Ruderern bei 85,9 pmol/l (R1).

Vergleich Studenten vs. Ruderer:

Es lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen vor.

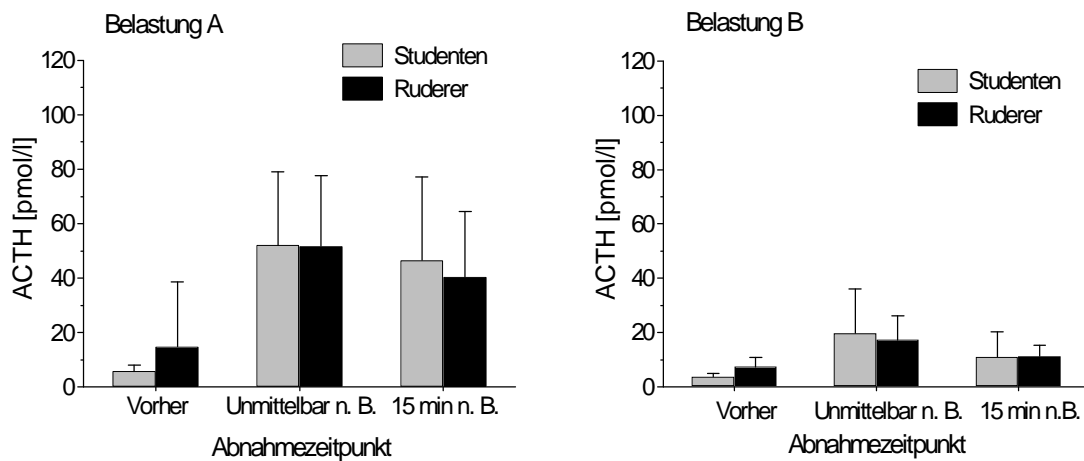


Abb. 5.1-9 Darstellung der ACTH-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Studenten vs. Ruderer vor sowie unmittelbar bzw. 15 min nach der Belastung A / B (mean±sd).

5.1.2.2. β_H -Endorphin-IRM

Während der Standardbelastung (Monate 1 bis 6) konnte nur in Ausnahmefällen bei den Studenten β_H -Endorphin-IRM im Plasma nachgewiesen werden. Bei den Ruderern ließ sich regelmäßig vor und unmittelbar nach der Belastung sowie 15 min nach Belastung β_H -Endorphin-IRM im Plasma nachweisen.

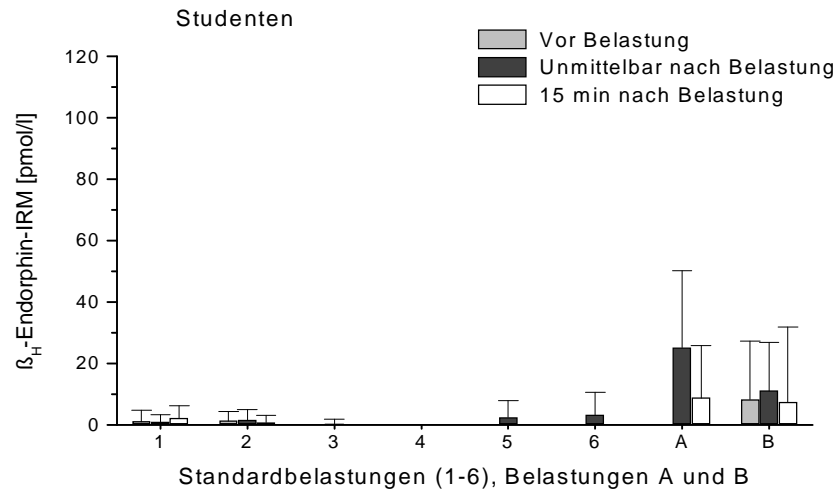


Abb. 5.1-10 Darstellung der β_H -Endorphin-IRM-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Studenten vor sowie unmittelbar bzw. 15 min nach der Belastung (mean \pm sd).

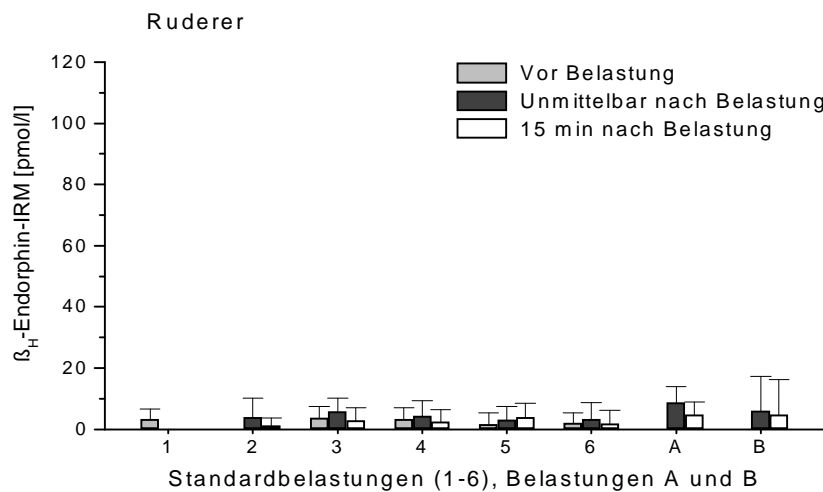


Abb. 5.1-11 Darstellung der β_H -Endorphin-IRM-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Ruderer vor sowie unmittelbar bzw. 15 min nach der Belastung (mean \pm sd).

Zusammenfassung der β_H -Endorphin-IRM-Konzentrationen bei Standardbelastung

In der Gruppe der Studenten ließ sich keine konstante β_H -Endorphin-IRM-Freisetzung in das Plasma beobachten. Der durchschnittliche Ruhewert der Ruderer lag bei $2,6 \pm 3,5$ pmol/l. Nach der Belastung stieg die Konzentration auf $3,8 \pm 4,9$ pmol/l und fiel 15 min nach Ende der Belastung auf $2,3 \pm 3,8$ pmol/l ($p=0,05$) (mean \pm sd).

Vergleich Studenten vs. Ruderer:

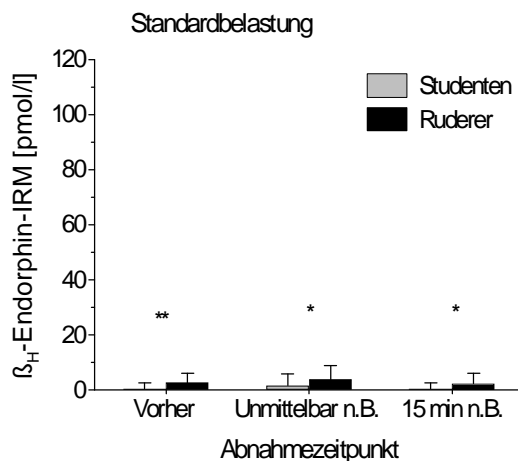


Abb. 5.1-12 Darstellung der β_H -Endorphin-IRM-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Studenten vs. Ruderer vor sowie unmittelbar bzw. 15 min nach der Standardbelastung (mean \pm sd).
(n.B.: nach Belastung)
Signifikante Unterschiede Studenten vs. Ruderer - *: $p=0,05$; **: $p=0,001$

β_H -Endorphin-IRM-Konzentrationen bei Belastung A und B

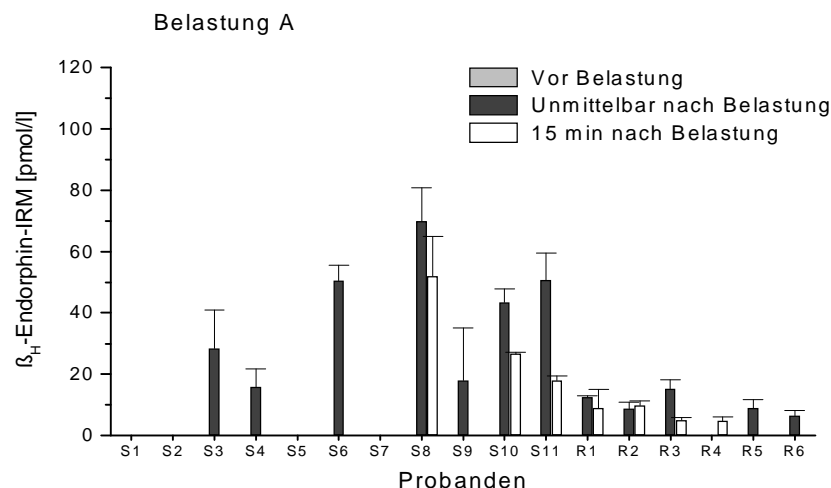


Abb. 5.1-13 Darstellung der β_H -Endorphin-IRM-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Studenten (S) und Ruderer(R) vor sowie unmittelbar bzw. 15 min nach der Belastung A (mean \pm sd).

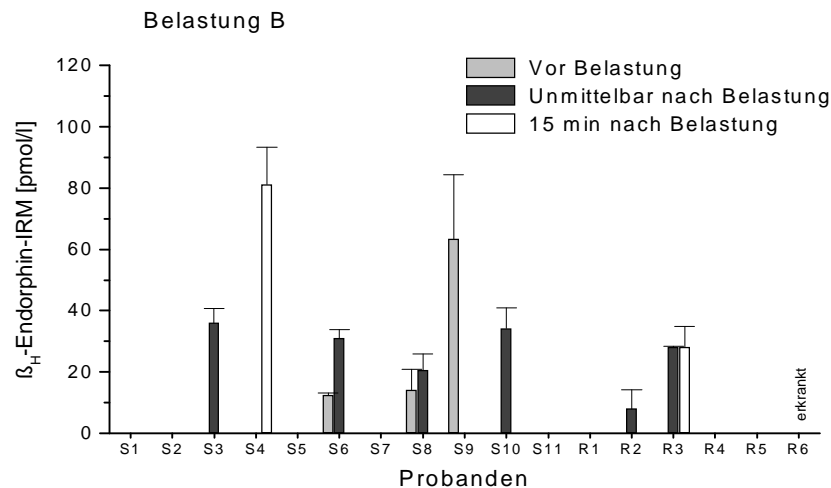


Abb. 5.1-14 Darstellung der β_H -Endorphin-IRM-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Studenten (S) und Ruderer(R) vor sowie unmittelbar bzw. 15 min nach der Belastung B (mean \pm sd).

5.1.2.3. β_H -Endorphin (1-31)

Die maximale Plasmakonzentration der Studenten in den Monaten 1 bis 3 betrug 20,4 pmol/l, während der Monate 4 bis 6 fanden sich zu allen Abnahmezeitpunkten deutlich höhere Plasmakonzentrationen. Diese Auffälligkeit zeigte sich auch bei den Ruderern entsprechend den Assayansätzen (siehe 4.4.2.6.).

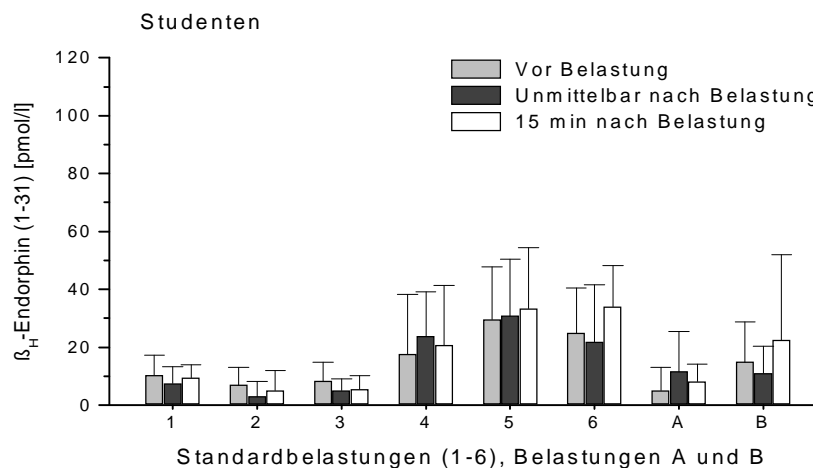


Abb. 5.1-15 Darstellung der β_H -Endorphin (1-31)-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Studenten sowie unmittelbar bzw. 15 min nach der Belastung (mean \pm sd). (Darstellung Belastung B ohne Wert von Student S7 mit 1710 pmol/l)

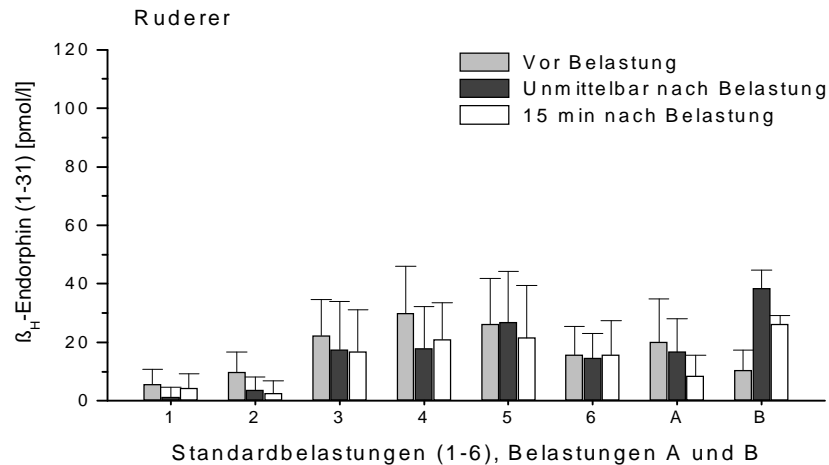


Abb. 5.1-16 Darstellung der β_H -Endorphin (1-31)-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Ruderer vor sowie unmittelbar bzw. 15 min nach der Belastung (mean \pm sd).

Einzeldarstellung der β_H -Endorphin (1-31)-Konzentrationen bei Belastung A und B

Während der Belastung A und B wurden sowohl bei den Ruderern als auch bei den Studenten höchste Konzentrationen an β_H -Endorphin (1-31) im Plasma sowohl vor und nach der Belastung, als auch 15 min nach Ende der Belastung. Eine einheitliche Peptidfreisetzung in Abhängigkeit zur Belastung A / B konnte weder in der Gruppe der Studenten, noch in der Gruppe der Ruderer beobachtet werden. Abb. 5.1-17 / 18 zeigen die Werte der einzelnen Versuchspersonen, die in Abb. 5.1-15 / 16 als Mittelwerte \pm sd zusammengefasst waren.

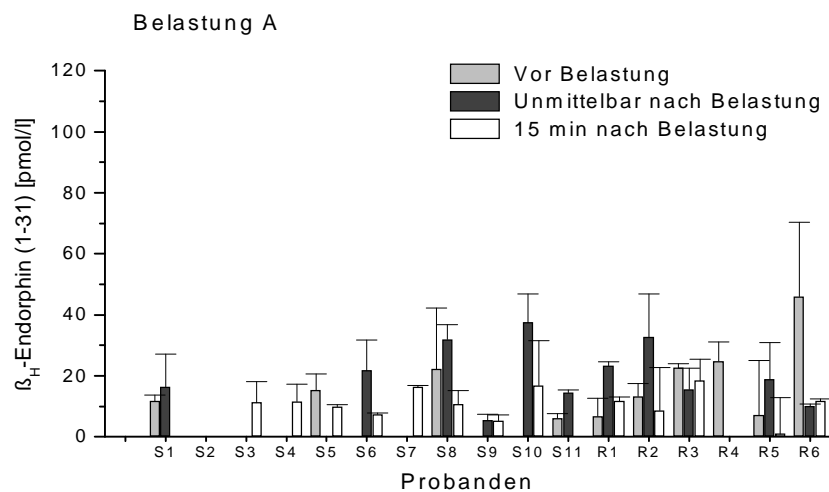


Abb. 5.1-17 Darstellung der β_H -Endorphin (1-31)-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Studenten (S) und Ruderer(R) vor sowie unmittelbar bzw. 15 min nach der Belastung A (mean \pm sd).

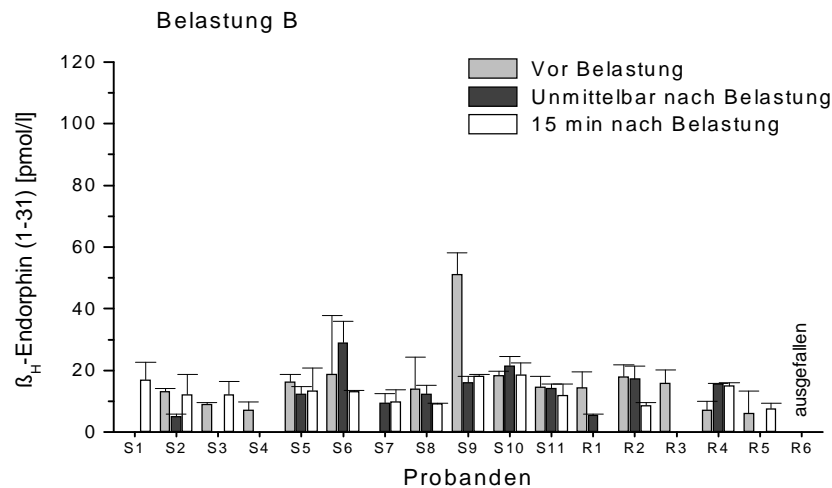


Abb. 5.1-18 Darstellung der β_H -Endorphin (1-31)-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Studenten (S) und Ruderer(R) vor sowie unmittelbar bzw. 15 min nach der Belastung B (mean±sd).

5.1.2.4. N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM

Im Plasma der Studenten wurden im Vergleich zu den Ruderern häufiger Nac-End-IRM-Plasmakonzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze von 3,5 pmol/l gefunden. Die höchsten Peptidkonzentrationen konnten vor der Belastung gemessen werden. Unmittelbar nach der Belastung kam es bei den Probanden zum Abfall der Nac-End-IRM-Plasmakonzentration, während 15 Minuten nach Ende der Belastung ein Anstieg beobachtet werden konnte.

Schaut man sich die Peptidkonzentrationen der Probanden einzeln an, zeigt sich eine hohe intraindividuelle Streuung. Beispielsweise lagen im Monat 2 vor der Belastung die Peptidkonzentrationen von 6 Studenten (S1,2,4,5,7,11) zwischen 4,3 und 11,6 pmol/l, während die übrigen 5 Studenten „Nullwerte“ aufwiesen. Im Monat 3 vor der Belastung zeigten 5 Studenten (S1,4,6,8,9) Nac-End-IRM-Konzentrationen im Bereich zwischen 6 und 10 pmol/l, während sich bei den übrigen 6 Studenten keine nachweisbaren Konzentrationen fanden. Von den 6 Studenten im Monat 2 zeigten nur zwei Studenten (S1,S4) auch im Monat 3 nachweisbare Nac-End-IRM-Plasmakonzentrationen. Die höchsten Plasmakonzentrationen an Nac-End-IRM wurden bei Student S7 in Monat 2 gemessen (vor der Belastung 11,6 pmol/l; nach der Belastung 6,8 pmol/l; 15 min nach Belastung 11,6 pmol/l), jedoch konnte bei diesem Probanden in den anderen Monaten mit Standardbelastung keine Peptidkonzentration oberhalb der Nachweisgrenze beobachtet werden.

Zur Vergleichbarkeit mit den Konzentrationen der anderen POMC-Fragmente wird zunächst eine identische Skalierung (0 bis 120pmol/l) der Graphiken gewählt.

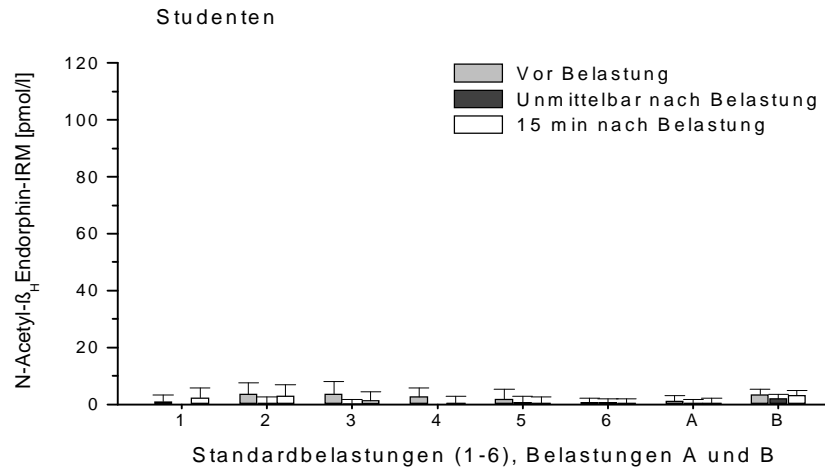


Abb. 5.1-19 Darstellung der Nac-End-IRM-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Studenten vor sowie unmittelbar bzw. 15 min nach der Belastung (mean±sd).

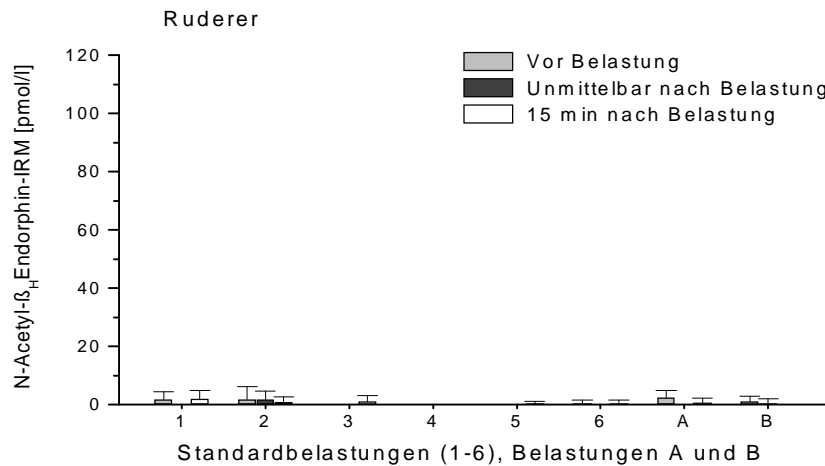


Abb. 5.1-20 Darstellung der Nac-End-IRM-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Ruderer vor sowie unmittelbar bzw. 15min nach der Belastung (mean±sd).

Zur besseren Übersicht folgt die Darstellung derselben Nac-End-IRM-Plasmakonzentrationen mit einer Skalierung von 0 bis 10 pmol/l:

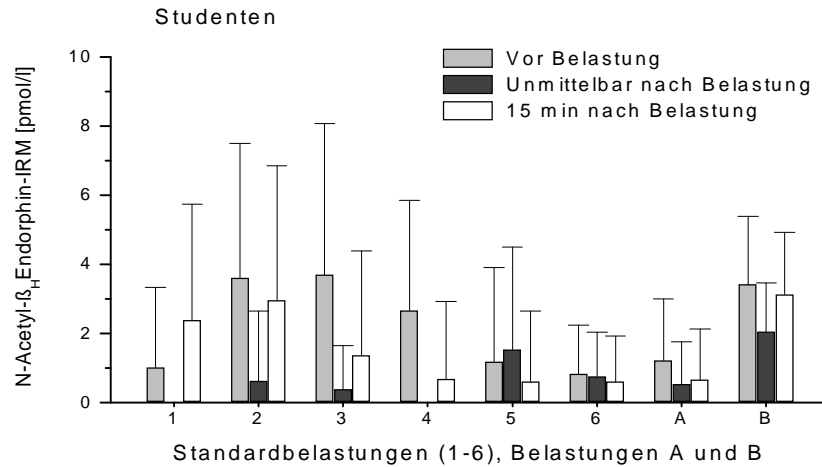


Abb. 5.1-21 Darstellung der Nac-End-IRM-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Studenten vor sowie unmittelbar bzw. 15 min nach der Belastung (mean±sd / Skalierung der Konzentration von 0 bis 10 pmol/l).

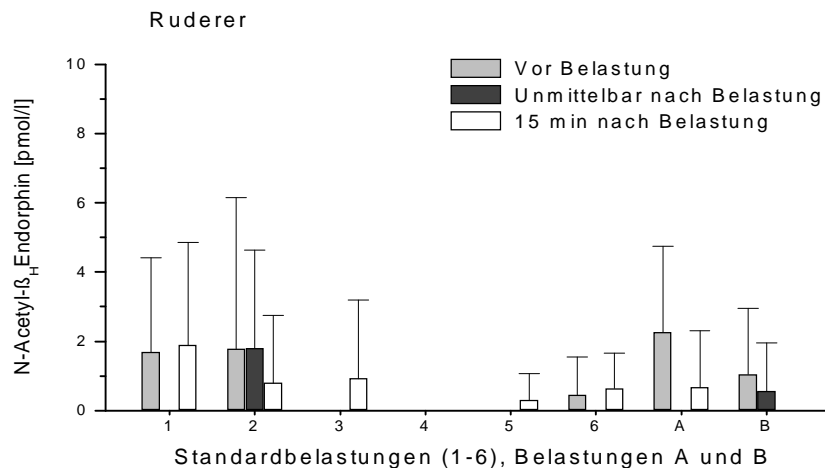


Abb. 5.1-22 Darstellung der Nac-End-IRM-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Ruderer vor sowie unmittelbar bzw. 15min nach der Belastung (mean±sd / Skalierung der Konzentration von 0 bis 10 pmol/l).

Zusammenfassung der N-Acetyl-β-H-Endorphin-IRM-Konzentrationen bei Standardbelastung

Vergleicht man die Nac-End-IRM-Plasmakonzentrationen der Studenten, so zeigt sich ein Abfall nach der Belastung ($p=0,01$). Der Anstieg der Nac-End-IRM-Plasmakonzentrationen 15 min nach Ende der Belastung ist ebenfalls signifikant ($p=0,01$).

Vergleich Studenten vs. Ruderer:

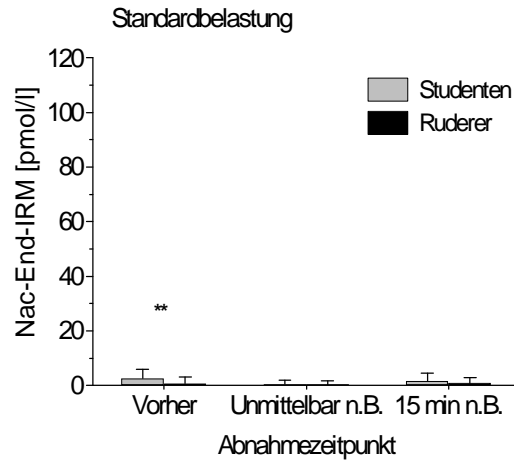


Abb. 5.1-23 Darstellung der NAC-End-IRM-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Studenten vs. Ruderer vor sowie unmittelbar bzw. 15 min nach der Standardbelastung (mean±sd). (n.B.: nach Belastung) Signifikante Unterschiede Studenten vs. Ruderer - **: p=0,001

N-Acetyl-β_H-Endorphin-IRM-Konzentrationen bei Belastung A und B

Die Peptidkonzentrationen vor und nach der Belastung sowie 15 min nach Ende der Belastung entsprachen den Befunden aus den Monaten 1 bis 6 (Standardbelastung). Bei der maximalen Ausbelastung (Belastung A) wurde im Gegensatz zu Belastung B nur in Ausnahmefällen Nac-End-IRM nachgewiesen.

Vergleich Studenten vs. Ruderer:

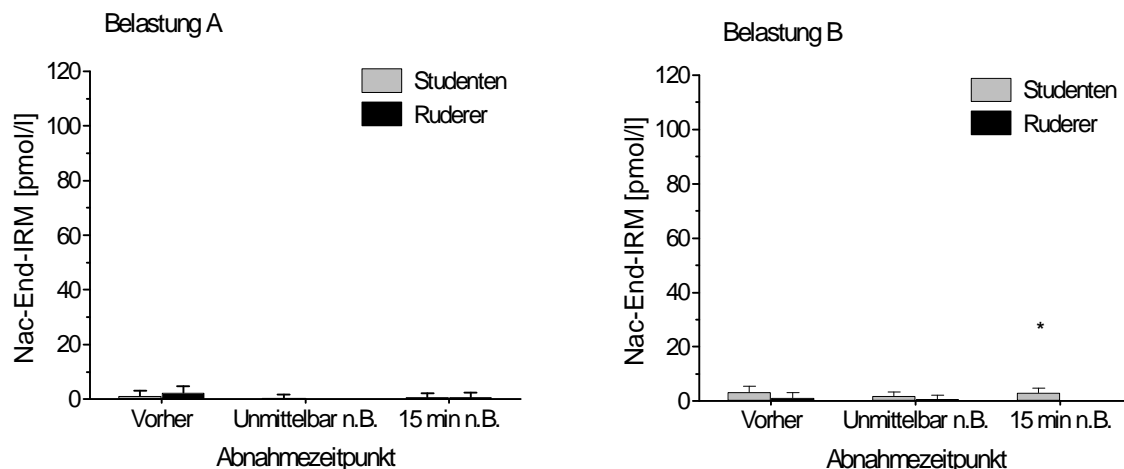


Abb. 5.1-24 Darstellung der NAC-End-IRM-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Studenten vs. Ruderer vor sowie unmittelbar bzw. 15 min nach der Belastung A / B (mean±sd). (n.B.: nach Belastung) Signifikante Unterschiede Studenten vs. Ruderer - *: p=0,05

5.1.2.5. β -MSH-IRM

Während der Standardbelastung (Monate 1 bis 6) konnte sowohl bei den Studenten als auch bei den Ruderern nur in seltenen Fällen β -MSH-IRM im Plasma nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu zeigte sich nach Belastung A (maximale Ausbelastung) bei nahezu allen Probanden ein Anstieg der Peptidkonzentration. Diese wiederum fiel 15 min nach Ende der Belastung ab. Nach Belastung B ließ sich nur noch bei wenigen Studenten β -MSH-IRM im Plasma beobachten.

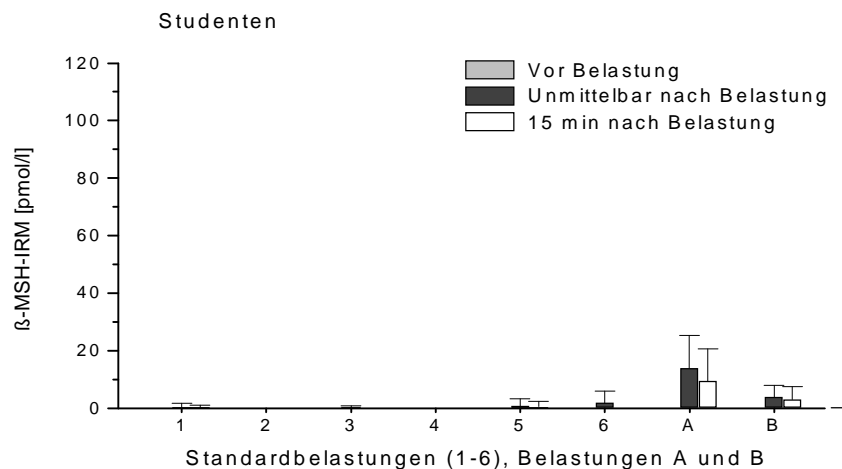


Abb. 5.1-25 Darstellung der β -MSH-IRM-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Studenten vor sowie unmittelbar bzw. 15 min nach der Belastung (mean \pm sd).

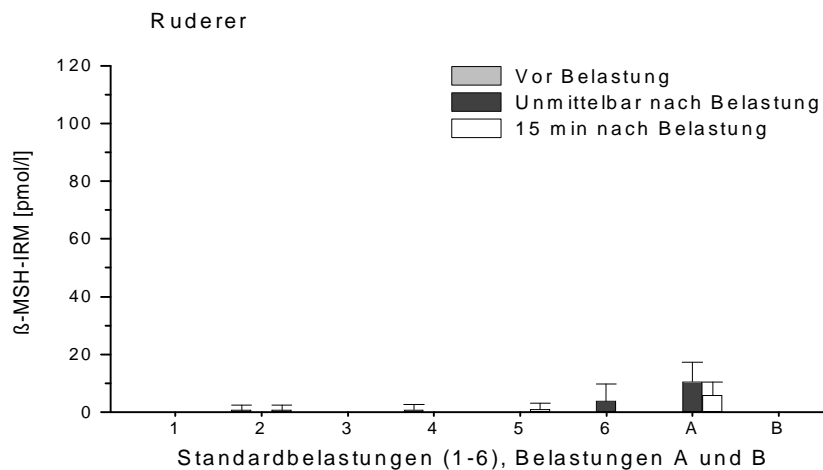


Abb. 5.1-26 Darstellung der β -MSH-IRM-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Ruderer vor sowie unmittelbar bzw. 15 min nach der Belastung (mean \pm sd).

Im Vergleich der Plasmakonzentrationen von β -MSH-IRM zeigte sich ein Anstieg nach der Belastung A ($p=0,001$) und ein Abfall 15 min nach Ende der Belastung ($p=0,01$).

Unterschiede zwischen den Studenten und Ruderern lagen nicht vor.

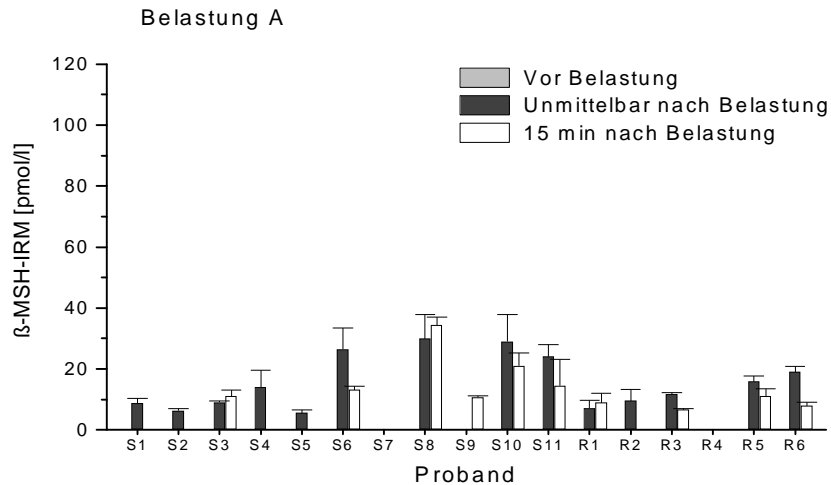


Abb. 5.1-27 Darstellung der β -MSH-IRM-Plasmakonzentrationen [pmol/l] der Studenten (S) und Ruderer (R) vor sowie unmittelbar bzw. 15 min nach der Belastung A (mean \pm sd).

5.2 Psychische Belastungssituation

Im Rahmen einer schriftlichen Semesterabschlussprüfung und einer mündlichen Nachprüfung wurden Herzfrequenzen zwischen 68 und 90 Schläge/min gemessen. Es ließen sich erhöhte Plasmakonzentrationen einzelner POMC-Derivate wie ACTH, β_H -Endorphin-IRM, β_H -Endorphin (1-31) und N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM vor der Prüfung nachweisen. Zu einem signifikanten Abfall der Plasmakonzentrationen nach der Prüfungssituation kam es bei ACTH ($p=0,05$), β_H -Endorphin-IRM und β_H -Endorphin (1-31) ($p=0,001$). Hierbei wiesen zwei Studenten (S6 und S8) sowohl bei β_H -Endorphin-IRM als auch bei β_H -Endorphin (1-31) Plasmakonzentrationen von über 500 pmol/l auf. Die Ursache hierfür bleibt unklar. Bei Nac-End-IRM konnten keine Konzentrationsunterschiede vor und nach der Prüfung beobachtet werden. Ebenso konnte bei keinem Probanden β -MSH-IRM oberhalb der Nachweisgrenze gemessen werden.

Proband	ACTH		β_{H} -End-IRM		β_{H} -End (1-31)		Nac-End-IRM		β -MSH-IRM	
	Vor	Nach	Vor	Nach	Vor	Nach	Vor	Nach	Vor	Nach
S4	7,2	2,2	0,0	0,0	9,8	11,2	5,3	4,9	0,0	0,0
S6	15	4	514,2	0,0	1180,3	9,5	5,1	4,7	0,0	0,0
S8	29,2	19,7	597,8	20,7	900,4	4,3	5,6	4,2	0,0	0,0
S9	42,9	2,7	20,0	0,0	30,8	21,9	0,0	0,0	0,0	0,0
S11	17,3	5,2	0,0	0,0	25,0	19,4	1,8	0,0	0,0	0,0

Tab. 5.2-1 POMC-Derivatkonzentrationen [pmol/l] vor und nach einer psychischen Belastungssituation (schriftliche Semesterabschlussprüfung / t=120 min).

Proband	ACTH		β_{H} -End-IRM		β_{H} -End (1-31)		Nac-End-IRM		β -MSH-IRM	
	Vor	Nach	Vor	Nach	Vor	Nach	Vor	Nach	Vor	Nach
S4	8,8	3,8	0,0	0,0	28,1	1,4	0,0	2,1	0,0	0,0
S9	15,3	3,3	0,0	0,0	16,8	13,1	0,0	2,6	0,0	0,0

Tab. 5.2-2 POMC-Derivatkonzentrationen [pmol/l] vor und nach einer psychischen Belastungssituation (mündliche Nachprüfung / t=30 min).

6. Diskussion

In zahlreichen Studien wurde der Einfluß physischer und psychischer Belastung auf die Freisetzung einzelner POMC-Fragmente untersucht. Das Hauptaugenmerk galt dabei dem ACTH und dem so genannten „ β -Endorphin“. Dem β -MSH oder N-Acetyl- β -Endorphin wurden dabei wohl auch aufgrund fehlender Nachweisverfahren allenfalls geringe Beachtung geschenkt. Ein Hauptproblem der bisher durchgeführten Studien war dabei der Einsatz verschiedener, unspezifischer Nachweisverfahren, die insbesondere bei dem Nachweis von „ β -Endorphin“ bis zu 10 verschiedene β -Endorphin-Derivate und ebenfalls weitere POMC-Fragmente wie zum Beispiel das β -LPH erfasst haben [Harbach et al. (2000); Schulz et al. (2000)]. Berichtet wurde aber in den meisten Fällen über „ β -Endorphin“ [Farrell et al. (2002); Schwarz u. Kindermann (1990); Heitkamp et al. (1993); Schedlowski et al. (1995); Goldfarb et al. (1991)]. In der vorliegenden Arbeit wurde durch den Einsatz verschiedener Nachweisverfahren zwischen β -Endorphin-IRM und β_H -Endorphin (1-31) differenziert.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von intensivem körperlichem Training auf die Freisetzung der POMC-Fragmente ACTH, β -Endorphin-IRM, β_H -Endorphin (1-31), N-Acetyl- β -Endorphin-IRM und β -MSH-IRM unter Ausschluss saisonaler Einflussfaktoren zu erfassen.

Als Grundlage für diese Studie dienen die Ergebnisse der Arbeiten von Harbach et al. (2000) und Schulz et al. (2000), (2003). Doch während in diesen Arbeiten Einzeluntersuchungen an verschiedenen Probandenkollektiven durchgeführt wurden, wird in der vorliegenden Studie, neben den erweiterten Untersuchungen an N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM und β -MSH-IRM, an zwei konstanten Probandenkollektiven vergleichend über einen Zeitraum von einem Jahr, in Form einer erstmals durchgeführten Langzeitstudie, sich einerseits identisch wiederholende, andererseits auch verschiedenartige physische Belastungen getestet. Zusätzlich werden bei einem konstanten Probandenkollektiv psychische Belastungssituationen in Form einer Semesterabschlussprüfung und in Form einer mündlichen Nachprüfung untersucht.

Somit sollte eine mögliche stressspezifische Freisetzung der verschiedenen POMC-Fragmente erfasst werden.

6.1.Diskussion der Methoden

6.1.1. Nachweisverfahren

Von der Blutabnahme bis zum eigentlichen Studienergebnis wird eine Vielzahl von Arbeitsschritten durchlaufen. Jeder Arbeitsschritt beinhaltet mögliche Störfaktoren oder Problematiken, die im weiteren Verlauf angesprochen werden.

6.1.1.1. Extraktion

Die Extraktion wird bei der Bestimmung der POMC-Derivate im Plasma eingesetzt, um eine Konzentrierung der Proben um das 10-fache zu erreichen. Hierbei können folgende Störfaktoren für eine Beeinflussung der Ergebnisse verantwortlich sein:

- Extraktionsrecovery < 100 %

Die Recovery von β -Endorphin-IRM liegt bei ca. 80 % [Wiedemann und Teschemacher (1983)]. Die Extraktionsrecovery von Nac-End-IRM und MSH-IRM ist bisher nicht bestimmt worden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass sie ebenfalls unter 100 % liegt.

- Bindungsfaktoren

Hildebrand et al. (1989) wiesen nach, dass im menschlichen Plasma Faktoren vorliegen können, die POMC-Fragmente binden. In einer solch gebundenen Form kann das Peptid von den Kartuschen nicht absorbiert und anschließend extrahiert werden. Hierdurch besteht eine mögliche Beeinflussung in Hinsicht auf den interindividuellen Vergleich.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass auch der intraindividuelle Vergleich, also der Vergleich der Ergebnisse aus den verschiedenen Abnahmemonaten von nur einer Person negativ beeinflusst wird. Es kann nicht vorausgesetzt werden, dass die Konzentration der Peptidbindungsfaktoren bei einer Person innerhalb dieses Versuchszeitraumes von 11 Monaten konstant bleibt.

- pH-Wert

Nach der Zentrifugation der gewonnen Blutprobe wird das Plasma mit 1-normaler HCL angesäuert. Dies kann zu einer Konformationsänderung der POMC-Derivatmoleküle führen, die sich dadurch ebenso der Extraktion entziehen [Bolten et al. (1984)].

6.1.1.2. Aliquotieren

Nach der Extraktion wird das Plasma gefriergetrocknet (Lyophilisation) und im Anschluss mit 500 ml Puffer C restituiert. Hierzu werden die Proben 4 Stunden bei 4°C maschinell geschüttelt. Trotz des langen Zeitraums bleiben feste, flottierende Bestandteile in den Proben. Diese können einen Teil der POMC-Derivate beinhalten oder binden, die dann durch die Zentrifugation aus der Probe eliminiert werden.

6.1.1.3. Radioimmunometrische Nachweisverfahren

Eine zentrale Rolle in diesen Nachweisverfahren spielen die verwendeten Antikörper / Seren, die gegen einzelne Epitope, meist bestehend aus 3-4 Aminosäuren des entsprechenden POMC-Fragmentes, gerichtet sind.

Fluid Phase-One Site Radioimmunoassay

Im Rahmen des Fluid Phase-One Site RIA werden polyklonale Antiseren eingesetzt. Sie zeichnen sich durch eine hohe Bindungsaffinität gegenüber dem Antigen aus. Ihre Schwäche liegt in ihrer geringen Epitopspezifität. Das bedeutet, dass gleichzeitig verschiedene Antikörper an verschiedene Epitope eines Fragmentes binden können.

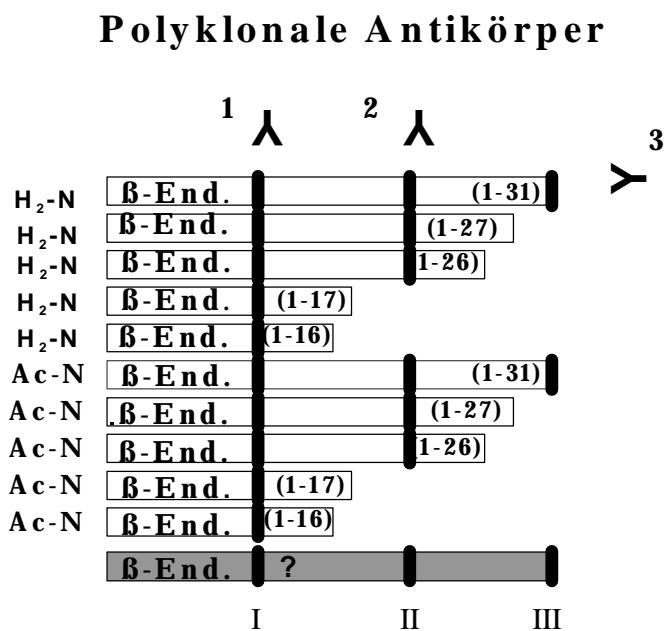


Abb. 6.1-1 Beispiele von möglichen Bindungsstellen (I,II,III) polyklonaler Antiseren (1,2,3) an β_H -Endorphin-Derivaten.

Unter ausschließlicher Verwendung von polyklonalen Antiseren kann β_H -Endorphin nicht spezifisch nachgewiesen werden. Die Abbildung zeigt, dass die Epitope Bestandteile der Fragmente β_H -Endorphin (1-31), (1-27), (1-26), (1-17), (1-16) sowie derer acetylierten Formen sein können. Somit kann der Fluid Phase-One Site RIA diese 10 oder mehr verschiedene Fragmente erfassen. Aber auch andere Peptide, die ebenfalls die entsprechenden Epitope aufweisen, werden erfasst wie z.B. β -LPH mit einer Kreuzreaktivität von 54 % (siehe 4.4.2.5.). Dies führt zu falsch-hohen Werten.

Man kann also nicht von authentischem β_H -Endorphin (1-31) sprechen, sondern muss hier den Begriff „ β_H -Endorphin-immunorektives Material“ (IRM) verwenden. Für den Nachweis von N-Acetyl- β -Endorphin und β -MSH wurde ebenfalls dieses Verfahren eingesetzt, auch hier spricht man korrekterweise von N-Acetyl- β -Endorphin-IRM und β -MSH-IRM.

Fluid Phase-Two Site Radioimmunoassay

Für den spezifischen Nachweis von β_H -Endorphin (1-31) wurde ein Fluid Phase-Two Site RIA verwendet [Harbach et al. (2000); Schulz et al. (2000)]. Bei diesem Nachweisverfahren werden monoklonale und polyklonale Antikörper verwendet.

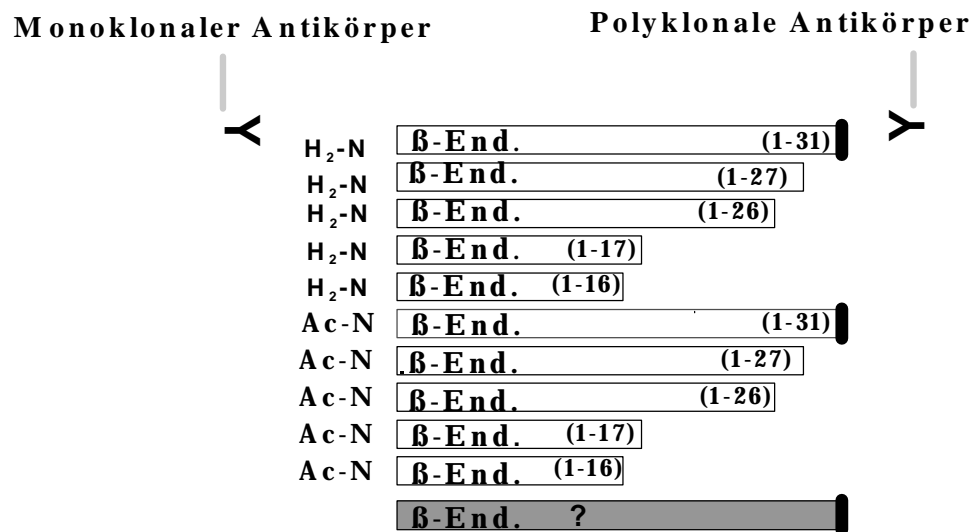


Abb. 6.1-2 Bindungsstellen der Antikörper auf β_H -Endorphin (1-31) bei einem Fluid Phase-Two Site RIA.

Durch die coaxiale Bindung der Antikörper an C- und N-Terminus des POMC-Fragmentes wird eine hohe Spezifität erreicht; die übrigen β -Endorphin-Derivate werden nicht erfasst. Ein Nachteil der monoklonalen Antikörper ist die geringere Affinität gegenüber ihren Epitopen. Somit sinkt die Empfindlichkeit dieses Nachweisverfahrens.

Weitere Störfaktoren der immunometrischen Nachweisverfahren:

- Antikörperbindungsfaktoren

Kreuzreagierende Peptide können zur Bindung von Antikörpern führen. Kommt es dabei zur Antikörpersättigung, können weitere POMC-Fragmente nicht mehr erfasst werden. Solche Peptide können bei bis zu 40 % der Testpersonen im Plasma nachgewiesen werden [Boscato et al. (1986)]. Eine ausreichende Zufuhr von Antiserum kann diesen Störfaktor reduzieren.

- Antikörpersättigung durch POMC-Fragmente

Eine Antikörpersättigung kann auch durch eine hohe Konzentration von POMC-Fragmenten selbst hervorgerufen werden. Diesem Effekt begegnet man mit einer Verdünnung der Probe und einer Erhöhung der Antikörpermenge („high-dose-hock-Effekt“) [Rayll et al. (1982); Chard et al. (1990)].

- Interferenzfaktoren

Eine Hyperlipidämie und auch Komplementfaktoren stellen Einflussfaktoren beim RIA dar [Käpyhaho et al. (1989)].

- Substanzen

Es ist denkbar, dass beispielsweise falsch temperierte Pufferlösungen oder ein alter Tracer zu verfälschten Ergebnissen führen können.

Aus diesen Gründen wurden bisherige „schlechte“ Erfahrungen bezüglich dieser Problematiken im Rahmen der vorliegenden Arbeit beachtet, um diese Fehlerquellen möglichst zu reduzieren.

6.1.1.4. Statistische Auswertung

Über die immunometrischen Nachweisverfahren erhalten wir Signale in Form von Gamma-Strahlen, die als Counts quantifiziert werden. Zur Auswertung dieser Radioaktivität werden so genannte Standardkurven erstellt. Die hierzu benötigten Standardproben werden aus Plasmaproben gewonnen. Das Plasma wird hier jedoch von allen eventuell enthaltenen POMC-Fragmenten befreit (Plasmafiltrat) und anschließend mit definierten Mengen des zu bestimmenden Peptides versetzt. Alle weiteren Schritte (Immunometrische

Nachweisverfahren) sind identisch mit denen, die die Probandenproben durchlaufen. Da die Konzentrationen der Standards in den Standardproben bekannt sind, können die zugehörigen Radioaktivitäten herangezogen werden, um im Vergleich die POMC-Derivat-Konzentrationen der Probandenproben zu berechnen. Hieraus folgt, dass bei fehlerhafter Standardkurve die berechneten Konzentrationen [pmol/l] falsch sein können. Um dieses zu vermeiden, wurden grundsätzlich 3 oder mehr Standardkurven für einen RIA erstellt, auf die gegebenenfalls zurückgegriffen werden konnte.

„B0-Problematik“

Anhand der B0-Proben wird die Nulllinie der Standardkurven bestimmt. Diese wird durch eine Anzahl von $n = 8 \pm 2$ Proben ermittelt. Aus diesen 8 ± 2 Werten wird ein Mittelwert \pm Standardabweichung (cpm) berechnet. Theoretisch sollten nun die cpm-Werte der Probanden kleiner oder gleich dem B0 sein. cpm-Werte oberhalb von B0 würden negative Peptidkonzentrationen anzeigen, was „physiologischer Unsinn“ wäre (Eigenschaften des Fluid Phase-One Site Radioimmunoassays als Kompetitionstest 4.4.2.4.). Nun lässt sich der B0-Wert experimentell nicht als Punkt festlegen, sondern er lässt sich nur als Wahrscheinlichkeitsbereich zwischen den Werten $B0 - 1.\text{Standardabweichung}$ bis $B0 + 1.\text{Standardabweichung}$ bestimmen. Somit sollten die cpm-Werte der Proben ohne nachweisbare Peptidkonzentrationen innerhalb des Bereichs $B0\text{-Wert} \pm 1.$ Standardabweichung liegen. Beispiel der Werteverteilung eines Radioimmunoassays:

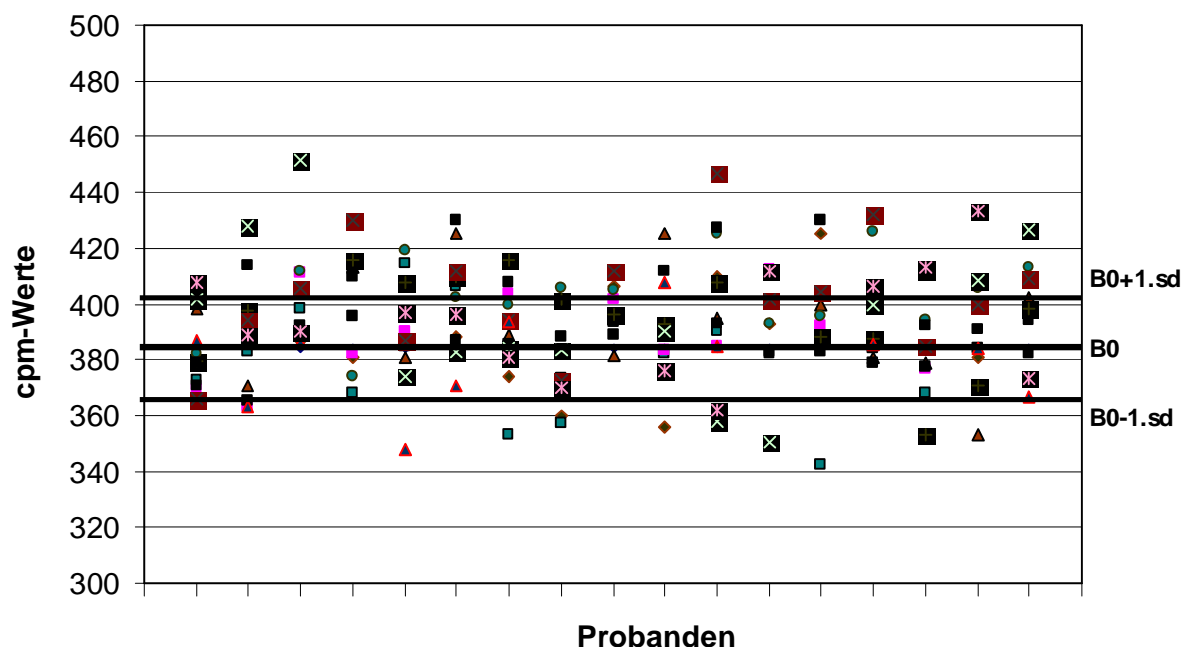


Abb. 6.1-3 cpm-Werte von Probandenproben aus einem RIA (Beispiel: β -MSH-IRM)

In Abb. 6.1-3 streuen die einzelnen cpm-Werte der Probanden nicht um B0 (384 cpm), den theoretischen Nullwert, sondern um 403 cpm ($B0 + 1 \cdot \text{Standardabweichung}$). Ca. 35 % aller cpm-Werte sind also größer als der B0-Wert. Rechnerisch liegen also negative Peptidkonzentrationen in hoher Anzahl vor, die jedoch nicht existieren können. Somit muss die Schlussfolgerung gezogen werden, dass der experimentell ermittelte B0-Wert zu niedrig liegt. Diese Problematik der Standardkurven ist kein Einzelfall, sondern ein bekanntes Problem.

Ursache hierfür können Störfaktoren wie die Peptid- oder Antikörperbindungsfaktoren sein, die von Proband zu Proband in unterschiedlicher Höhe im Plasma vorkommen können. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass auf Grund von Unterschieden in der sterischen Konfiguration der Peptide oder auf Grund von anderen unbekannten Einflussgrößen das Plasmafiltrat für die Standardproben zuvor nicht vollständig von allen POMC-Derivaten befreit wurde.

Hieraus würde sich die Schlussfolgerung ergeben, dass idealerweise für jeden einzelnen Probanden aus seinem eigenen Plasma eine „eigene“ Plasmastandardkurve zur Auswertung erstellt werden sollte. Hierzu müsste jedem Probanden pro Peptid 300 ml Blut entnommen werden. Abgesehen von der Belastung der einzelnen Versuchspersonen, ist dieses bei 17 Probanden und dem daraus folgenden Probenumfang nicht realisierbar.

Anhand der „B0-Problematik“ zeigt sich, dass ein großer Teil an Daten sich der Auswertung entzieht, da, wie beschrieben, bei cpm-Werten $> B0 - 1 \cdot \text{Standardabweichung}$ die Werte auf Null gesetzt werden. Ebenso wird der Mittelwert auf Null gesetzt, wenn nur ein Wert der Doppelmessung größer $B0 - 1 \cdot \text{Standardabweichung}$ beträgt. Nur wenn beide cpm-Werte signifikant $\neq B0$ sind ($< B0 - 1 \text{sd}$), liegt ein Peptidnachweis vor. Somit wurden cpm-Änderungen vor / nach Belastung, die unter dem festgelegten Nullniveau lagen, nicht dargestellt. Mögliche (wahrscheinlich geringere!) Konzentrationsänderungen der Peptide könnten somit nicht erfasst worden sein.

Um eventuelle Abhängigkeiten des B0-Wertes von der Plasmagewinnung bzw. Aufbereitung und Weiterverarbeitung nachzuweisen, wurde eine separate Versuchsreihe durchgeführt. Hierzu wurden aus Blutproben nur B0-Werte bestimmt. Dabei wurde die Plasmagewinnung und Verarbeitung auf verschiedene Art und Weise variiert. Es kamen verschiedene Abnehmeröhrchen mit unterschiedlichen Durchmessern zum Einsatz. Hierdurch wurde das Blut unterschiedlich schnell auf 4°C heruntergekühlt. Zusätzlich eingefügte Filtrationsschritte

sollten eventuelle Störfaktoren beseitigen. Verschieden lange Aufbewahrungszeiten der Blutproben auf Eis sollten Abhängigkeiten von Verarbeitungsgeschwindigkeiten nachweisen. Alle Variationen der Blut- und Plasmaverarbeitung zeigten jedoch in ihren Resultaten keine signifikanten Unterschiede zu der herkömmlichen Vorgehensweise.

Alternative statistische Auswertung

Der teilweise hohe Verlust an Datenmenge führte zur Entwicklung eigener Auswertverfahren mit mathematischen „Klimmzügen“ wie beispielsweise einer Taylerreihe 1. und 2. Ordnung. Weiterhin wurden die Ergebnisse unabhängig von den Standardkurven statistisch ausgewertet. Hierzu wurden die reinen cpm-Werte einer multifaktoriellen Varianzanalyse unterzogen. Ein Ranking mit Hilfe des Friedmanntestes wurde ebenso in Betracht gezogen.

Das folgende Beispiel zeigt die Ergebnisse einer Multifaktoriellen Varianzanalyse zur Auswertung von ACTH:

<u>ACTH - Multifaktorielle Varianzanalyse</u>										
Faktoren: Gruppe: Studenten zu Ruderer										
Zeit: Monat zu Monat										
Belastung: Vorher (1) zu Nachher (2) zu 15 min Pause (3)										
Signifikanzniveau:										
p > 0,05: nein p < 0,05: ja p < 0,01: 2ja p < 0,001: 3ja										
Die nicht genannten Faktoren werden gemittelt und nicht berücksichtigt.										
Monat	M 1 / 3	M 1 / 4	M 1 / A	M 1 / B	M 4 / 6	M 4 / A	M 4 / B	M 6 / A	M 6 / B	M 7 / B
Gruppe	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Zeit	nein	nein	3ja	nein	nein	2ja	nein	2ja	nein	3ja
Belastung	3ja	ja	3ja	ja	ja	3ja	ja	3ja	ja	3ja

Tab. 6.1-6 Multifaktorielle Varianzanalyse von ACTH.

Weder experimentell noch durch Verwendung alternativer Vorgehensweisen der statistischen Auswertung konnte die „B0-Problematik“ gelöst werden. Eine Darstellung der Rohdaten ohne Abzug der Leerwerte und Verwendung der Standardkurven würde einerseits die „Bo-Problematik“ umgehen, andererseits wäre ein direkter Vergleich der Assays und somit der Plasmakonzentrationen miteinander nicht möglich. Eine Angabe statistischer Signifikanzen

bezüglich der Anstiege oder Abfälle von Plasmakonzentrationen wäre zwar möglich, Unterschiede im Ausmaß der Anstiege oder Abfälle ließen sich jedoch nicht zeigen. Quantitative Aussagen über saisonale Effekte oder Trainingsbedingte Effekte wären somit nicht möglich.

Auch im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Ergebnissen dieser Arbeit mit den Ergebnissen der bisher veröffentlichten Studien beschränkt sich die Auswertung auf die des etablierten Verfahren mit Standardkurven und Darstellung der Ergebnisse mit dem Student T-Test.

6.1.2. Physische Belastungssituationen

Die Probanden absolvierten drei verschiedene physische Belastungssituationen auf einem Concept-II-Ruderergometer. Im Vergleich zu den in den Studien eingesetzten Fahrradergometern oder Laufbändern erfordert der Bewegungsablauf auf einem Ruderergometer den dynamischen Einsatz einer höheren Anzahl an Muskelgruppen (70-80 % der Skelettmuskulatur) [Steinacker et al. (1997)].

Die Standardbelastung während der Monate 1 bis 6 kann als moderate anaerobe Belastung eingestuft werden und soll, unter Berücksichtigung der Ergebnisse bisheriger Studien, zu einer Freisetzung von ACTH und β_{H} -Endorphin-IRM führen [Heitkamp et al. (1993), (1996); Schwarz und Kindermann (1992); Schulz et al. (2000), (2003)]. Die zu erbringende Leistung wurde, basierend auf dem Laktatstufentest, für jeden Probanden individuell festgelegt. Dies ermöglicht trotz unterschiedlicher Leistungsfähigkeiten den Vergleich der einzelnen Probanden untereinander. Weiterhin ist ein Vergleich zwischen dem Kollektiv der trainierten und untrainierten Probanden möglich. Die Laktatkonzentration aller Probanden nach der Standardbelastung lag bei $5,9 \pm 1,6$ mmol/l (mean \pm sd).

Diese Belastung wurde über 6 Monate beibehalten, sodass eine saisonale Beobachtung möglich war. Veränderungen in der POMC-Fragmentzusammensetzung über diesen Zeitraum bei den Ruderern könnten somit als Trainingseffekt gewertet werden. Liegen gleichzeitig solche Veränderung bei den nicht trainierenden Studenten vor, muss ein saisonaler Effekt in Betracht gezogen werden.

Wird die Belastung durch einen 2-minütigen Endspurt zu einer maximalen Ausbelastung (Belastung A) gesteigert, sollte es ebenso zu einer gesteigerten POMC-Fragmentfreisetzung kommen [Farell et al. (1987)]. Somit sollte der Effekt einer additiven Ausbelastung dargestellt werden. Petraglia et al. (1988) zeigen, dass eine isolierte Maximalbelastung mit einer Dauer von 10 bis 30 Sekunden ausreichen, um einen Anstieg an β_{H} -Endorphin-IRM im Plasma

hervorzurufen. Die Intensität der Belastung B entspricht der Leistung der abschließenden 2 minütigen Ausbelastung der Belastung A, die hier isoliert, d.h. ohne vorausgegangene Versuchsbelastung absolviert wurde. Dabei nimmt Belastung B eine Mittelstellung zwischen Standardbelastung und Belastung A ein und kann als submaximale Belastung betrachtet werden. Der Vergleich der drei verschiedenen Belastungsintensitäten sollte eine mögliche stressspezifische Freisetzung der unterschiedlichen POMC-Fragmente nachweisen.

6.1.3. Psychische Belastung

In den letzten 15 Jahren weisen zahlreiche Studien den Einfluss von psychischem Stress auf die Freisetzung von POMC-Fragmenten nach [Al'Absi et al. (2000); Miller et al. (1993); Sheps et al. (1995); Schedlowski et al. (1995); Leino et al. (1995); Schulz (2003)]. Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, 5 Studenten während einer psychischen Stresssituation (Semesterabschlussprüfung) auf eine mögliche POMC-Fragmentfreisetzung zu untersuchen. Somit sollten auch mögliche psychische Einflussfaktoren im Vorfeld der physischen Belastungssituationen bei der Ergebnisbetrachtung dieser Arbeit berücksichtigt werden.

6.2. Diskussion der Ergebnisse

6.2.1. Kontrollparameter

Die Herzfrequenz und die Laktatplasmakonzentrationen dienen als Anhaltspunkte für die Belastungsintensität [Jacobs et al. (1986); Marriott et al. (1996)].

Die während der Standardbelastung (Monate 1 bis 6) gemessenen Herzfrequenzen und Laktatkonzentrationen bleiben über diesen Zeitraum konstant. Dies könnte zu der Schlussfolgerung führen, dass nicht nur die geforderte Leistung, sondern auch die körperliche Beanspruchung für jeden einzelnen Probanden konstant geblieben ist. Betrachtet man die Laktatkonzentrationen der Standardbelastung ($5,9 \pm 1,6$ mmol/l), so liegt die Belastungsintensität im anaeroben Bereich, jedoch müssen interindividuelle Unterschiede des anaeroben Schwellenbereichs berücksichtigt werden [Urhausen et al. (1993)]. Die Laktatkonzentrationen der einzelnen Personen blieben über den Zeitraum von 6 Monaten (Standardbelastung) mit einer geringen Streuung konstant. Trainingseffekte oder saisonale Einflussfaktoren können nicht beobachtet werden.

Bei der additiven 2-minütigen Ausbelastung (Belastung A) steigen signifikant die Herzfrequenzen auf über 200 Schläge/min und die zugehörigen Laktatwerte auf bis zu 24 mmol/l, so dass eine maximale Ausbelastung vorliegt. Nach Belastung B liegt die mittlere Herzfrequenz bei den Ruderern und den Studenten 20 Schläge/min tiefer als nach Belastung A, die Laktatwerte liegen im Mittel bei den Studenten 4 mmol/l, bei den Ruderern 5 mmol/l tiefer. Ähnliche Laktatkonzentrationen sowie vergleichbare Herzfrequenzen wurden bei der Untersuchung submaximaler Belastungsintensitäten in Arbeiten von Urhausen et al. (1993) und Beneke (1995) gefunden.

6.2.2. ACTH (1-39)

ACTH wurde in vielen Studien in Zusammenhang mit physischen Belastungssituationen nachgewiesen. Dabei wurden die Belastungsart, Intensität und Dauer variiert.

Einen Ausschnitt aus den vorliegenden Studien zeigt die folgende Tabelle. Die Studien sind nach den Belastungsintensitäten - moderate, submaximale, maximale Belastung und Ausdauerbelastung – und in zweiter Linie nach den ACTH-Plasmakonzentrationen unterteilt. Die grau unterlegten Studien stellen die drei Belastungsformen dieser Arbeit dar.

Studie	Prob.	Belastung	HF [S./min]	Laktat [mmol/l]	Dauer / Intensität	ACTH [pmo/l]
--------	-------	-----------	----------------	--------------------	--------------------	-----------------

Studien mit moderater Belastung

Luger et al. (1987)	21M	Laufband		2,5 5 11	30 min 50 VO _{2max} 30 min 70 VO _{2max} 30 min 90 VO _{2max}	<10 <20 50±14
Kraemer et al. (1989)	23M/F	Lauf	153		30 min Belastung bei 80 % HF	< 10
Standardbelastung	17M	Ruderergo.	164±17	5,9±1,6	30 min	15±12,4

Studien mit submaximaler Belastung

Schwarz u. Kindermann (1990)	12M	Fahrradergo.		12±2	1 min Ausbelastung	9±5
Belastung B	17M	Ruderergo.	172±20	13,8±4,3	2 min	19±14
Schulz et al. (2000)	23M	Ruderergo.	185	16,6 ±2,7	10 min / 1 min Ausbelastung	41,7±28,9
Farrel et al. (1987)	14M	Laufband			2 min 110 VO _{2max}	61,5±7,2

Studie	Prob.	Belastung	HF [S./min]	Laktat [mmol/l]	Dauer / Intensität	ACTH [pmol/l]
--------	-------	-----------	----------------	--------------------	--------------------	------------------

Studien mit maximaler Ausbelastung

Oleshansky et al. (1990)	17M	Laufband	181		Steig. bis Ausb. 13 bis 16,5 min	15,5±3,5
Schwarz u. Kindermann (1990)	12M	Fahrradergo.	187±9	10±1,6	Steig. bis Ausb. 20 min	19±10
Rahkila et al. (1988)	10M	Laufband	185±4	10,1±0,9	Steig. bis Ausb. 10 min	21,8±1,51
Heitkamp et al. (1993)	16M	Laufband	185	9,6	Steig. bis Ausb. bis 60 min	28±11
Inder et al. (1998)	6M	Fahrradergo.			Steig. bis Ausb. 60 min	40±6
Heitkamp et al. (1996)	14F	Laufband	185	6,7	Steig. bis Ausb.	45±36
Belastung A	17M	Ruderergo.	191±17	18,3±5,2	Steig. bis Ausb. 30 min	51,9±25,7
de Diego Acosta et al. (2001)	19M	Laufband			Steig. bis Ausb. 1 bis 60 min	63±30

Studien mit Ausdauerbelastung

Heitkamp et al. (1993)	16M	Marathon	bis 158	3,5	176 min	27±11
Heitkamp et al. (1996)	14F	Marathon	169	3,8	3 h 21 min	39±22
Petraglia et al. (1988)	27M	100-10000 m Lauf			(keine Angaben)	40±6

Tab. 6.2-1 Darstellung der ACTH-Plasmakonzentrationen [pmol/l], Laktatkonzentrationen [mmol/l] und Herzfrequenzen [S./min] nach der jeweiligen Belastung (mean±sd).

(Abkürzungen – S: Herzaktionen, Steig. bis Ausb.: Steigerung bis zur Ausbelastung)

Standardbelastung

Die in Tab. 6.2-1 dargestellten Studien weisen alle nach der Belastungssituation einen Anstieg und nach einer folgenden Ruhepause einen Abfall der ACTH-Plasmakonzentrationen auf. Die Höhe der Konzentrationen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Belastung ist abhängig von der Intensität, Dauer und Art der Belastung.

Betrachtet man die ACTH-Plasmakonzentrationen der Studenten und der Ruderer, so zeigen sich im Vergleich zu den Ergebnissen der dargestellten Studien keine wesentlichen Unterschiede. In beiden Gruppen kommt es nach der Belastung zu einem signifikanten Anstieg der ACTH-Plasmakonzentration und 15 min nach der Belastung wieder zu einem signifikanten Abfall.

Die Betrachtung einzelner Studenten im zeitlichen Verlauf der sich wiederholenden Standardbelastungen zeigt, trotz konstanter Belastungsintensität, vergleichbaren Herzfrequenzen und vergleichbaren Laktatplasmakonzentrationen Unterschiede der ACTH-Plasmakonzentrationen vor und nach der sich wiederholenden Belastungen. Bei einigen Probanden steigt die ACTH-Plasmakonzentration nach der Belastung nicht an, sondern bleibt konstant oder fällt ab. Bei den Ruderern lassen sich diese ACTH-Konzentrationsänderungen nicht beobachten. Der interindividuelle Vergleich zwischen den Probanden zeigt, dass einige höhere ACTH-Plasmakonzentrationen aufweisen als andere Probanden mit vergleichbaren Leistungen. Dennoch bleiben die Unterschiede innerhalb einer Gruppe zu jedem Abnahmezeitpunkt (vor, unmittelbar nach der Belastung, 15 min nach Belastung) in einem gewissen Schwankungsbereich konstant. Signifikante Konzentrationsunterschiede lassen sich beim interindividuellen Vergleich weder bei den Studenten noch bei den Ruderern nachweisen. Eine Ausnahme bilden die ACTH-Plasmakonzentrationen der Studenten unmittelbar bzw. 15 min nach der 1. Standardbelastung.

	Student S1			Student S6		
Standard-Belastung	Leistung [Watt]			Leistung [Watt]		
	50	90	120	60	100	130
	Vorher	Unmittelbar n.B.	15 min n.B.	Vorher	Unmittelbar n.B.	15 min n.B.
	Laktat [mmol/l]			Laktat [mmol/l]		
1	1,9	5,7	3,3	1,9	3,3	1,8
2	1,3	5,2	2,2	1,5	2,8	1,3
3	1,4	7,7	2,3	--	--	--
4	1,2	4,6	2,7	1,3	6	2,4
5	2	5,3	2,7	1,5	4,3	2,1
6	1,4	5,8	1,7	1,6	3,8	2
	Herzfrequenz [Schläge/min]			Herzfrequenz [Schläge/min]		
1	86	132	84	72	140	96
2	80	124	88	80	140	92
3	76	148	72	--	--	--
4	68	136	84	88	172	104
5	80	144	92	88	160	96
6	88	124	80	72	160	88

	ACTH [pmol/l]			ACTH [pmol/l]		
1	5,6	21,7	14,6	8,2	4,1	2,8
2	7,0	5,2	3,2	7,6	3,8	3,3
3	4,1	7,9	5,2	--	--	--
4	6,9	4,9	3,8	10,1	5,1	3,8
5	4,5	8,7	5,1	6,7	4,5	2,8
6	3,5	3,7	3,5	7,3	3,9	2,5

Tab. 6.2-2 Inter- und intraindividueller Vergleich von ACTH [pmol/l] am Beispiel der Studenten S1 und S6 unter Berücksichtigung der Herzfrequenz [Schläge/min], der Laktatplasmakonzentration [mmol/l] und der Leistung [Watt].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde darauf geachtet, äußere Einflussfaktoren wie zum Beispiel die Umgebungstemperatur bei den Versuchsbelastungen konstant zu halten [Castellani et al. (2002); Williams et al. (2002)], so dass eventuelle Konzentrationsänderungen von ACTH bei Standardbelastung während der Monate 1 bis 6 gegebenenfalls auf saisonale Einflussfaktoren oder, in der Gruppe der Ruderer, auf Trainingseffekte zurückgeführt werden können.

Doch weder in der Gruppe der Studenten noch in der Gruppe der Ruderer werden in diesem Zeitraum von 6 Monaten signifikante Konzentrationsveränderungen bei den Peptidkonzentrationen vor der Belastung, unmittelbar nach der Belastung oder 15 min nach Ende der Belastung beobachtet. Somit konnten in dieser Arbeit weder saisonale Einflussfaktoren noch Trainingseffekte auf die Freisetzung von ACTH nachgewiesen werden. Ähnliche Befunde erhoben Malarkey et al. (1995).

Die ACTH-Plasmakonzentrationen vor der Belastung betragen bei den Studenten $5,6 \pm 2,6$ pmol/l, bei den Ruderern $6,9 \pm 3,0$ pmol/l (mean \pm sd) und sind somit vergleichbar mit den Ergebnissen aus den Studien von Kraemer RR et al. (1989), Oleshansky et al. (1990) und Schulz et al. (2000). Diese Plasmakonzentrationen sind im Verhältnis zu den Normwerten in den frühen Abendstunden (1,1 bis 4,5 pmol/l) erhöht. Der Körper scheint somit im Vorfeld der Belastung mit einer Peptidfreisetzung zu reagieren. Möglicherweise könnte dies als eine Art „Bereitschaftsreaktion“ des Organismus in Erwartung einer Stresssituation gewertet werden. Ähnliche Ergebnisse zeigt die Studie von Schulz (2003), in der Skispringer auf Grund der außergewöhnlichen Stresssituation vor dem Flug erhöhte ACTH-Konzentrationen im Plasma aufweisen. Schedlowski et al. (1995) weisen bei Fallschirmspringern vor dem Sprung ebenso erhöhte ACTH-Plasmakonzentrationen nach.

Nach der Belastung sind die Plasmakonzentrationen der Studenten und der Ruderer vergleichbar mit den Ergebnissen einer Studie von Luger et al. (1987). Änderungen der ACTH-Plasmakonzentrationen werden während der Monate 1 bis 6 nicht beobachtet. Lediglich in Monat 1 zeigt sich bei den Studenten eine höhere ACTH-Plasmakonzentration im Vergleich zu den Folgemonaten. Die Belastung scheint trotz identischer Leistung und zugehörigen konstanten Laktatplasmakonzentrationen im ersten Monat höher zu sein als in den übrigen Monaten. Eine Erklärung hierfür könnte in der für die Studenten völlig neuen Belastungssituation, zum einen auf einem unbekannten Ruderergometer zum anderen unter erstmals bestehenden Versuchsbedingungen gefunden werden.

Die Ruderer sind solche „Testsituationen“ durch ihr tägliches Training und durch ihre Teilnahme an u.a. internationalen Ergometerwettkämpfen und Studien gewohnt. Sie weisen im ersten Monat keine höheren Werte im Vergleich zu den anderen Monaten auf.

Belastung A / Belastung B

Die Ergebnisse der Studenten und Ruderer unter beiden Belastungen bestätigen die Ergebnisse vergleichbarer Studien von Farrel et al. (1987), Schwarz u. Kindermann (1990), Heitkamp et al. (1996), Schulz et al. (2000), siehe Tab. 6.2-1.

Eine Ergänzung der Standardbelastung durch einen 2-minütigen Endspurt bis zur maximalen Ausbelastung und körperlichen Erschöpfung (Belastung A) führt zur Erhöhung der ACTH-Plasmakonzentrationen der Studenten auf $52 \pm 26,8$ pmol/l und der Ruderer auf 51 ± 25 pmol/l ($p=0,001$). Wird ein isolierter 2-minütiger Endspurt mit gleicher Leistung (P_{\max}) wie unter Belastung A aus einem körperlich ausgeruhten Zustand absolviert (Belastung B), können Konzentrationsanstiege bei den Studenten auf $19,8 \pm 16,2$ pmol/l und bei den Ruderern auf $17,3 \pm 8,9$ pmol/l beobachtet werden. Bei dem Vergleich dieser Befunde mit den ACTH-Konzentrationen nach Standardbelastung (Studenten: $7,2 \pm 5,5$ pmol/l; Ruderer: $17,1 \pm 11,8$ pmol/l) zeigt sich, dass bei den hohen Belastungsintensitäten vergleichbare ACTH-Plasmakonzentrationen bei den Studenten und Ruderern vorliegen, während bei der im unteren anaeroben Belastungsbereich liegenden Standardbelastung ein deutlicher Unterschied der ACTH-Plasmakonzentrationen gefunden wird. Somit führt intensives körperliches Training langfristig zu einer erhöhten ACTH-Freisetzung im unteren anaeroben Belastungsbereich.

Nach der Belastung zeigen sich sowohl bei den Studenten als auch bei den Ruderern vergleichbare Abfälle der ACTH-Plasmakonzentrationen.

Trainingseffekte / Vergleich Studenten vs. Ruderer

Um den Einfluss von intensivem körperlichen Training auf die Freisetzung von POMC-Fragmenten unter sportlicher Belastung zu beurteilen, kann einerseits ein konstantes Probandenkollektiv vor und nach einem Trainingsprogramm auf die POMC-Fragmentfreisetzung getestet werden [Heitkamp et al. (1998); Gomez-Merino et al. (2002)], andererseits können ein trainiertes und ein untrainiertes Probandenkollektiv bei einer Belastungssituation miteinander verglichen werden [Luger et al. (1987); Kraemer et al. (1989); Heitkamp et al. (1998)].

Die Befunde der vorliegenden Arbeit schließen einen Einfluss von intensivem körperlichen Training über einen Zeitraum von 6 Monaten bei konstanter Versuchsbelastung auf die ACTH-Plasmakonzentrationen vor, unmittelbar nach und 15 Minuten nach der Belastung aus. Bisherige Ergebnisse der vorliegenden Studien zeigen unterschiedliche Einflüsse von körperlichem Training auf die Freisetzung von ACTH. Gomez-Merino et al. (2002), sowie Engfred et al. (1994) können ebenso keinen Einfluss von dreiwöchigem bzw. fünföchigem Training auf die ACTH-Freisetzung feststellen. Der initiale Trainingszustand der Probanden in diesen Studien wird als „durchschnittlich“ beschrieben. Im Gegensatz hierzu zeigt die Studie von Tabata et al. (1990) nach einem siebenöchigen Training verminderte ACTH-Plasmakonzentrationen nach der Belastungssituation, während eine Studie von Heitkamp et al. (1998) nach einem achtöchigen Training erhöhte ACTH-Plasmakonzentrationen vor der Belastungssituation nachweist. Möglicherweise ist der unterschiedliche „Ausgangs-Trainingszustand“ der Probanden zu Beginn der Untersuchung eine Ursache für diese widersprüchlichen Ergebnisse. So waren die von Heitkamp untersuchten Probanden in einem durchschnittlichen Trainingszustand, während in der vorliegenden Arbeit Hochleistungssportler mit einem Trainingsaufwand von mehr als 20h pro Woche über Jahre hinweg untersucht wurden.

Vor den Standardbelastungen wurden in dieser Arbeit ACTH-Plasmakonzentrationen über dem circadianen Normwert beobachtet. Dabei zeigen die Ruderer in den Monaten 2 bis 6 vor der Belastung höhere ACTH-Plasmakonzentrationen als die Studenten ($p=0,05$). Ähnliches wurde von Luger et al. (1987) und Petraglia et al. (1988) gefunden. Da sich in den Monaten 1 bis 6 der Standardbelastung kein Einfluss von intensivem körperlichem Training in dieser Zeit auf die ACTH-Plasmakonzentration in Ruhe findet, müsste die Ursache der erhöhten ACTH-Plasmakonzentration bei den hochtrainierten Ruderern in einem deutlich längeren Trainingsprozess begründet sein. Zieht man hierbei die Befunde von Luger et al. (1987) und Petraglia et al. (1988) in Betracht, die in ihren Arbeiten den Einfluss von körperlichem

Training auf untrainierte / mäßig trainierte Probanden untersuchten, so scheint im Gegensatz zu den in dieser Arbeit untersuchten Hochleistungssportlern bei einem schlechteren Trainingsausgangszustand auch eine kürzere Trainingsperiode zur gesteigerten ACTH-Plasmakonzentration im Vorfeld einer Belastung zu führen.

Im Gegensatz hierzu fanden Krämer et al. (1989) keinen Unterschied der ACTH-Konzentrationen vor einer Belastung zwischen trainierten und untrainierten Probanden; Diego Acosta et al. (2001) fanden sogar höhere ACTH-Plasmakonzentrationen bei untrainierten im Vergleich zu trainierten Probanden. (Genaue Angaben über den wöchentlichen Trainingsaufwand / Trainingszustand der Probanden werden in diesen Arbeiten nicht gemacht.)

Während der Standardbelastung liegen die ACTH-Konzentrationen der Ruderer nicht nur vor der Belastung, sondern auch unmittelbar nach der Belastung und nach 15 min Pause signifikant über denen der Studenten. Bei den Studenten liegt sogar die mittlere ACTH-Plasmakonzentration 15 min Pause nach der Belastung unter der Plasmakonzentration vor der Belastung ($p=0,01$). Zieht man die Ergebnisse der Studie von Petraglia et al. (1988) mit in Betracht, in der zwei Tage vor einer Belastung keine erhöhten oder unterschiedlichen ACTH-Konzentrationen im Plasma bei den trainierten und untrainierten Probanden nachgewiesen werden, so könnten diese Ergebnisse die sogenannte „Bereitschaftsreaktion“ im Vorfeld einer Belastung bestätigen.

Wird die Belastungsintensität gesteigert (Belastung A und B), sind die ACTH-Plasmakonzentrationen nach der Belastung bei den Studenten und den Ruderern identisch. Studien von Oleshansky et al. (1990) und de Diego Acosta et al. (2001) zeigen ähnliche Ergebnisse, während Farell et al. (1987) bei untrainierten Probanden im Vergleich zu trainierten Probanden nach der Belastung geringere ACTH-Konzentrationen im Plasma nachwiesen.

Unter Belastung A zeigt Student 8 unmittelbar nach einer Maximalleistung von 343,9 Watt die höchste ACTH-Plasmakonzentration von 116,5 pmol/l, nach 15 min Pause 107,2 pmol/l. Damit lagen diese beiden Werte deutlich über den gemessenen ACTH-Plasmakonzentrationen aller Ruderer. Auffallend war, dass der Proband im Anschluss an die Belastung nicht in der Lage war, aus eigener Kraft vom Ruderergometer aufzustehen. Zusätzlich zeigte der Proband vagale Reaktionen wie Übelkeit und Schwindelgefühl, die für 30 min anhielten. Ähnlich hohe ACTH-Plasmakonzentrationen mit vagalen Reaktionen nach maximaler Ausbelastung wurden in einer Studie von Kraemer RR et al. (1989) gefunden.

Oleshansky et al. (1990) wiesen nach, dass die Geschwindigkeit des Konzentrationsabfalls von ACTH nach der Belastung vom Trainingsstatus der Probanden abhängig ist. Die ACTH-Plasmakonzentration fällt in der Erholungsphase bei trainierten Probanden schneller als bei untrainierten Probanden ab. Unter Belastung A können ähnliche Ergebnisse beim Vergleich der Ruderer mit den Studenten beobachtet werden.

6.2.3. β_H -Endorphin

Der Einfluss physischer Belastung auf die Freisetzung von „ β_H -Endorphin“ wird in vielen Arbeiten zum Teil kontrovers diskutiert. Ein Grund hierfür könnte sein, dass nicht authentisches β_H -Endorphin (1-31), sondern durch den Einsatz vieler verschiedener Nachweisverfahren sogenanntes β_H -Endorphin-IRM, eine Zusammensetzung aus einer Vielzahl an Endorphin-Derivaten (siehe Abb. 1.3-1), seinen N-acetylierte Formen sowie β -Lipotropin nachgewiesen wurde [Höhl et al. (1986); Cumming et al. (1987); Chan et al. (1992); McLoughlin et al. (1993); Gibson et al. (1993); Oleshansky et al. (1990); Viru et al. (1994)]. In dieser Arbeit wird durch den Einsatz von zwei verschiedenen Nachweisverfahren zwischen β_H -Endorphin-IRM und β_H -Endorphin (1-31) differenziert.

6.2.3.1. β_H -Endorphin-IRM

Standardbelastung

Während der Standardbelastungen wurde bei den Studenten nur in Ausnahmefällen β_H -Endorphin-IRM vor, unmittelbar nach oder 15 min nach der Belastung nachgewiesen. Somit kann ein möglicher saisonaler Einfluss nicht erfasst werden.

Dieser Befund steht im Widerspruch zu den Arbeiten von Goldfarb et al. (1991) und Kraemer RR et al. (1989), die sowohl vor als auch nach einer 30-minütigen Belastung mit vergleichbarer Intensität β_H -Endorphin-IRM in einer Größenordnung zwischen 4 und 15 pmol/l nachweisen. Eine mögliche Ursache können die in diesen Arbeiten eingesetzten unterschiedlichen Nachweisverfahren sein.

Im Gegensatz zu den Studenten lassen sich bei den Ruderern unter Standardbelastung in 2/3 aller Messungen vor, unmittelbar bzw. 15 min nach Ende der Belastung β_H -Endorphin-IRM im Plasma nachweisen. Betrachtet man die Durchschnittswerte der Befunde, so liegen diese in der gleichen Größenordnung wie die Studienergebnisse von Goldfarb et al. (1991) und

Kraemer RR et al. (1989), die wie bei den Ergebnissen der Ruderer nach der Belastung einen Konzentrationsanstieg von β_H -Endorphin-IRM nachweisen.

Schaut man sich die Ergebnisse der Ruderer im Einzelnen an, so zeigen sich einige Auffälligkeiten. Man findet sowohl eine hohe interindividuelle als auch intraindividuelle Varianz. Dabei betragen die Peptidkonzentrationen 0 bis 13 pmol/l unabhängig vom Abnahmemonat oder dem Zeitpunkt der Blutabnahme (vor / nach der Belastung / nach 15 min Pause). Wie die Arbeit von Viru et al. (1994) vergleichbar zeigt, lässt sich bei einigen Probanden eine erhöhte Peptidkonzentration vor der Belastung und ein Konzentrationsabfall nach der Belastung beobachten. Dies würde ähnlich wie bei ACTH auch bei β_H -Endorphin-IRM für eine „Bereitschaftsreaktion“ im Vorfeld einer physischen Belastung sprechen.

Belastung A / Belastung B

Die Ergebnisse der Studenten und Ruderer unter Belastung A zeigen vergleichbare Befunde mit den Studien von Petraglia et al. (1988), Oleshansky et al. (1990) und Heitkamp et al. (1993).

Eine Ausweitung der Standardbelastung durch einen 2-minütigen Endspurt bis zur Ausbelastung führt zu einer Erhöhung der β_H -Endorphin-IRM-Plasmakonzentration bei den Studenten auf 25 ± 25 pmol/l und bei den Ruderern auf $8,7 \pm 5,2$ pmol/l ($p=0,01$). Doch nicht bei allen Probanden kommt es bei maximaler Ausbelastung zu einer Freisetzung von β_H -Endorphin-IRM.

Wird ein 2-minütiger Endspurt mit gleicher Leistung (P_{\max}) wie unter Belastung A aus einem körperlich ausgeruhten Zustand absolviert (Belastung B), findet sich nur noch bei der Hälfte der Probanden β_H -Endorphin-IRM im Plasma. Für die Studenten scheint Belastung B in der Höhe der Intensität und Peptidfreisetzung eine Zwischenstellung zwischen Standardbelastung und Belastung A darzustellen.

Werden die Ergebnisse der drei Belastungsintensitäten gegenübergestellt, so zeigt sich, dass erst bei Überschreiten einer individuell unterschiedlichen „Schwelle“ eine β_H -Endorphin-IRM-Freisetzung beobachtet werden kann. Ähnliche Ergebnisse zeigen die Arbeiten von Farrel et al. (1987), Rahkila et al. (1988), Schwarz u. Kindermann (1990), Goldfarb et al. (1991) und Viru et al. (1995). Hierbei liegen deutliche interindividuelle und intraindividuelle Unterschiede bezüglich der Konzentration und des Zeitpunktes der Peptidfreisetzung in das Plasma vor. Kommt es zur Ausbelastung (Belastung A), kann bei den meisten Probanden ein signifikanter Anstieg der Peptidkonzentrationen nach der Belastung und ein Konzentrationsabfall 15 min nach Ende der Belastung beobachtet werden. Diese Befunde

werden in den Arbeiten von Petraglia et al. (1988), Farrel et al. (1987), Schwarz u. Kindermann (1990) und Schulz (2003) bestätigt.

Trainingseffekt / Vergleich Studenten vs. Ruderer

Wie die Ergebnisse der Ruderer unter Standardbelastung zeigen, wird in dieser Arbeit kein Einfluss von intensivem Training über einen Zeitraum von 6 Monaten auf die β_H -Endorphin-IRM-Freisetzung nachgewiesen. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Studien von Colt et al. (1981), Howlett et al. (1984), Corck et al. (1985), Kraemer et al. (1989) und steht im Widerspruch zu den Studien von Carr et al. (1981) und Heitkamp et al. (1998).

Sehr wohl findet man Unterschiede zwischen den Hochleistungsruderern und den Studenten. Die Ruderer zeigen sowohl vor, unmittelbar nach und 15 min nach der Belastung höhere β_H -Endorphin-IRM-Plasmakonzentrationen als die Studenten. Ähnliche Befunde wurden in den Arbeiten von Kraemer RR et al. (1989) und Viru et al. (1994) nachgewiesen, bei denen trainierte Probanden höhere Peptidkonzentrationen aufweisen als untrainierte Probanden, während Farrell et al. (1987) und Goldfarb et al. (1991) in ihren Arbeiten keine Unterschiede aufzeigen konnten.

Im Rahmen der Ausbelastung weisen die Studenten nach der Belastung höhere β_H -Endorphin-IRM-Plasmakonzentrationen auf als die Ruderer ($p = 0,01$). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit der Studie von Farrell et al. (1987). Ähnlich wie bei ACTH lässt sich die höchste β_H -Endorphin-IRM-Konzentration bei Student 8 ($P_{\max} = 343,9$ Watt) mit $69,8$ pmol/l beobachten, während der leistungsstärkste Ruderer 6 ($P_{\max} = 530,5$ Watt) nur $6,5$ pmol/l aufweist. Da sowohl bei den Ruderern als auch bei einzelnen Studenten unter Belastung A Peptidkonzentrationen < 10 pmol/l gefunden werden, scheint die Höhe der Endorphin-IRM-Plasmakonzentrationen kein Maß für die erbrachte Leistung zu sein.

Diese Arbeit zeigt, dass Training bzw. der Trainingsstatus die Freisetzung von β_H -Endorphin-IRM zu beeinflussen scheint.

6.2.3.2. β_H -Endorphin (1-31)

In dieser Arbeit wurde ein Two-Site-Radioimmunoassay zum spezifischen Nachweis von authentischem β_H -Endorphin (1-31) unter physischer Belastung eingesetzt. Sowohl bei den Studenten als auch bei den Ruderern ließ sich regelmäßig vor, unmittelbar nach und 15 min nach der Belastung bei den verschiedenen Belastungsformen authentisches β_H -Endorphin (1-31) im Plasma nachweisen. Beispielsweise liegt die mittlere β_H -Endorphin (1-31)-

Plasmakonzentration bei den Studenten in den Monaten mit Standardbelastung bei 23 pmol/l, während β_H -Endorphin-IRM nur in seltenen Fällen im Plasma gefunden wird (mittlere β_H -Endorphin-IRM-Plasmakonzentration der Studenten bei Standardbelastung 1 pmol/l). Diese Befunde stehen im Widerspruch zu den Arbeiten von Harbach et al. (2000) und Schulz et al. (2003). Hier wurde bei nachweisbaren β_H -Endorphin-IRM-Plasmakonzentrationen nur in Ausnahmefällen und zum Teil mit deutlich geringeren Konzentrationen authentisches β_H -Endorphin (1-31) im Plasma gefunden. Da β_H -Endorphin (1-31) nur einen von vielen Bestandteilen des immunoreaktiven Materials darstellt, sind die Befunde dieser Studien plausibel.

Eine mögliche Erklärung für diese scheinbar „unmöglichen“ Befunde in der vorliegenden Arbeit könnte in den verschiedenen Nachweisverfahren begründet sein. Beide Verfahren beruhen auf Antigen-Antikörper-Bindungsreaktionen mit Bildung von Immunkomplexen. Es wäre möglich, dass unterschiedliche sterische Konfigurationen von β_H -Endorphin-IRM und β_H -Endorphin (1-31) im Bereich der Antikörperbindungsstellen dazu führen, dass β_H -Endorphin (1-31) im Fluid Phase-Two Site RIA erfasst wird und im Fluid Phase-One Site RIA (Nachweisverfahren des immunoreaktiven Materials) die Bindungsstellen „blockiert“ sind und somit β_H -Endorphin-IRM nicht nachgewiesen werden kann.

Eine weitere Erklärung für diesen Widerspruch könnte im Zusammenhang mit den Problemen der Standardkurven, Nachweisgrenzen sowie der „B0-Problematik“ (siehe 6.1.1.4.) stehen, so dass die Konzentrationen an β_H -Endorphin (1-31) als falsch hoch angesehen werden müssten. Auf Grund dieser unbekannten Faktoren ist ein Vergleich der absoluten Peptidkonzentrationen nur bedingt zulässig. Die Auswertung an Hand der Konzentrationsverhältnisse bleibt jedoch gültig. Somit lassen sich qualitative Aussagen wie z.B. ein Anstieg oder ein Abfall von β_H -Endorphin (1-31) sowie die Konzentrationsverhältnisse zwischen den Gruppen innerhalb eines Assayansatzes (siehe 4.4.2.6.) beurteilen. Quantitative Konzentrationsvergleiche zwischen den Ergebnissen der drei verschiedenen Assayansätze sowie zwischen β_H -Endorphin (1-31) und β_H -Endorphin-IRM werden auf Grund der genannten Unklarheiten und der Möglichkeit eines systematischen Auswertfehlers nicht durchgeführt.

Standardbelastung

Sowohl bei den Ruderern als auch bei den Studenten wurde nach der Belastung ein Abfall der β_H -Endorphin (1-31)-Plasmakonzentrationen beobachtet. Bei der Betrachtung einzelner Probanden zeigt sich eine hohe inter- und intraindividuelle Streuung. So finden sich bei

einzelnen Probanden Anstiege und Abfälle der β_{H} -Endorphin (1-31)-Plasmakonzentrationen nach der Belastung.

Vergleicht man die Peptidkonzentrationen der einzelnen Monate (1 bis 6) miteinander, so zeigt sich bei den Studenten, dass die Durchschnittswerte in den Monaten 1 bis 3 um 15 pmol/l niedriger liegen als in den Monaten 4 bis 6. Bei den Ruderern liegt eine ähnlich hohe Differenz zwischen den Durchschnittswerten der Monate 1 und 2 und denen der Monate 3 bis 6 vor. Da diese beiden „Ergebnisgruppen“ durch zwei verschiedene Assayansätze mit verschiedenen Standardkurven ausgewertet wurden, dürfte die Ursache der Differenz eher in der „B0-Problematik“ oder in einem anderen unbekannten systemischen Fehler begründet sein als in einem möglichen saisonalen Effekt oder einem Trainingseffekt bei den Ruderern. Retrospektiv stellt sich bei einer durchgeführten Fehleranalyse heraus, dass auf Grund des hohen Probenaufkommens verschiedene Chargen an Mausantikörper bei den Assayansätzen verwendet wurden. Dies sollte keinen Einfluss haben, wäre aber ein möglicher Faktor für die Diskrepanz zwischen den einzelnen Assays untereinander.

Ähnlich wie bei ACTH und β_{H} -Endorphin-IRM können im ersten Monat bei den Studenten im Vergleich zu den folgenden Monaten erhöhte β_{H} -Endorphin (1-31)-Konzentrationen im Plasma festgestellt werden. Dies würde für eine gesteigerte β_{H} -Endorphin (1-31)-Freisetzung durch psychischen Stress (unbekannte Testsituation / unbekanntes Belastungsgerät) sprechen.

Belastung A / Belastung B

Bei der Betrachtung der Mittelwerte kommt es sowohl bei den Studenten als auch bei den Ruderern nach der Belastung A zu einem Anstieg der Plasmakonzentrationen und einem Konzentrationsabfall 15 min nach der Belastung. Die Einzelbetrachtung zeigt zum einen eine hohe interindividuelle Streuung mit Werten zwischen 0 und 46 pmol/l, zum anderen zeigt sie, dass bei einigen Probanden die höchsten Konzentrationen von β_{H} -Endorphin (1-31) vor der oder 15 min nach der Belastung gemessen wurden.

Ähnliche Befunde können unter Belastung B beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigen, dass Belastung B eine Zwischenstellung zwischen Belastung A und der Standardbelastung einnimmt. Zwischen den Ruderern und Studenten bestehen keine Unterschiede.

Vergleicht man die Peptidkonzentrationen der Studenten vor der Belastung A mit den Konzentrationen vor der Belastung B, so zeigt sich, dass vor Belastung B vermehrt β_{H} -Endorphin (1-31) in durchschnittlich höheren Konzentrationen nachgewiesen werden kann. Möglicherweise stellte Belastung A im Vorfeld keine wesentliche Stresssituation für die

Probanden dar. Mit der Erfahrung der maximalen Ausbelastung (Belastung A) könnte der Stressfaktor vor Belastung B gestiegen sein, sodass eine erhöhte präparative Peptidfreisetzung hervorgerufen wurde. Bei den Ruderern, die eine mehrjährige Wettkampferfahrung aufweisen, liegt dieser Unterschied nicht vor. Man kann davon ausgehen, dass weder Belastung A noch Belastung B für die Ruderer eine besondere Stresssituation darstellt.

Trainingseffekt / Vergleich Studenten vs. Ruderer

Zwischen den Studenten und den Ruderern können weder bei der Standardbelastung noch bei den Belastungen A oder B signifikante Unterschiede bezüglich der Freisetzung von β_{H} -Endorphin (1-31) nachgewiesen werden. Es scheint, dass intensives körperliches Training über mehrere Jahre die Freisetzung von β_{H} -Endorphin (1-31) nicht beeinflusst. Diese Aussage sollte jedoch kritisch betrachtet werden, da auf Grund der Schwierigkeiten beim Nachweis von β_{H} -Endorphin (1-31) möglicherweise signifikante Unterschiede nicht aufgedeckt werden konnten.

Aus den oben genannten Gründen steht fest, dass nur begrenzt mit entsprechenden Vorbehalten Schlussfolgerungen und Zusammenhänge zwischen β_{H} -Endorphin (1-31), β_{H} -Endorphin-IRM und physischer als auch psychischer Belastung gezogen werden dürfen. Auf Grund des begrenzten Probenmaterials ist eine erforderliche experimentelle Neuauswertung ebenfalls nicht möglich. Dennoch stellen die Ergebnisse eine interessante Grundlage für neue weiterführende Studien dar.

6.2.3.3 N-Acetyl- β_{H} -Endorphin-IRM

In dieser Arbeit wurde Nac-End-IRM unter verschiedenen Stresssituationen im Plasma von Probanden nachgewiesen. Vergleichbare Studien liegen uns zurzeit nicht vor.

Standardbelastung

Betrachtet man die Studenten vor und nach der Standardbelastung, so zeigt sich nach der Belastung ein Abfall der Nac-End-IRM-Plasmakonzentrationen ($p=0,001$) und 15 min nach Ende der Belastung ein Anstieg ($p=0,01$). Bei den Ruderern kommt es nur vereinzelt zu einer Peptidfreisetzung. Die nachgewiesenen Konzentrationen sind bis auf wenige Ausnahmen vor der Belastung oder 15 min nach Ende der Belastung mit denen der Studenten vergleichbar.

Trainingseffekte werden nicht beobachtet. Betrachtet man die Nac-End-IRM-Plasmakonzentrationen der Probanden im Einzelnen, so zeigen sich einige Besonderheiten, auf die im Folgenden eingegangen wird:

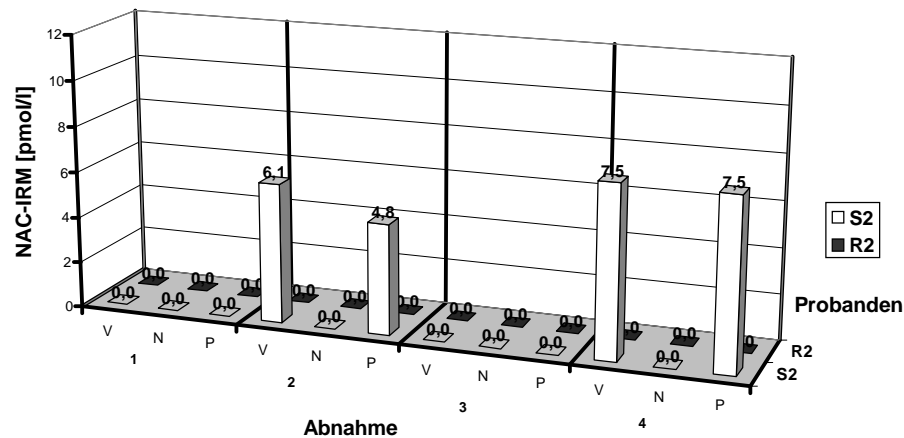


Abb. 6.2-3 Nac-End-IRM-Plasmakonzentrationen [pmol/l] von Student S2 und Ruderer R2. Darstellung der Konzentrationen vor (V) und unmittelbar nach (N) der Belastung sowie 15 Minuten nach Ende der Belastung (P), in den Monaten 1 bis 4 (Standardbelastung).

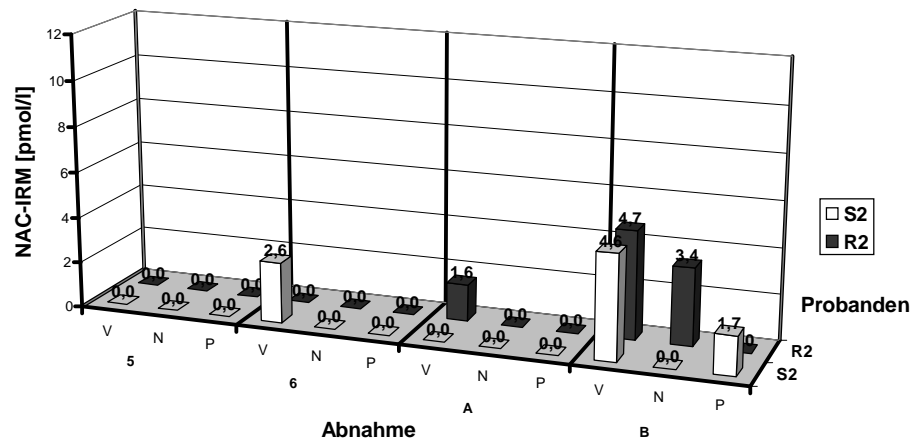


Abb. 6.2-4 Nac-End-IRM-Plasmakonzentrationen [pmol/l] von Student S2 und Ruderer R2. Darstellung der Konzentrationen vor (V) und unmittelbar nach (N) der Belastung sowie 15 Minuten nach Ende der Belastung (P), in den Monaten 5 bis 6 (Standardbelastung), sowie Belastungen A und B.

Unabhängig von der Belastungsart kommt es bei keinem Probanden zu einem Peptidanstieg nach der Belastung. Zwischen den Probanden liegt eine hohe interindividuelle Streuung vor, doch wie das Beispiel von Student S2 zeigt, kann auch eine hohe intraindividuelle Streuung im zeitlichen Verlauf beobachtet werden. Einige Studenten weisen in den Monaten mit Standardbelastung häufiger, andere weniger oft eine Nac-End-IRM-Freisetzung auf, aber bei keinem Studenten kann in allen 6 Monaten eine Freisetzung beobachtet werden.

Betrachtet man die Mittelwerte der Standardbelastung im Verlauf, so zeigt sich bei den Studenten, dass in den Wintermonaten (Dezember, Januar, Februar) im Vergleich zu den Frühjahrsmonaten (April, Mai) signifikant höhere Konzentrationen gemessen wurden ($p=0,05$). Hier ist kein Zusammenhang mit der Auswertung nachvollziehbar. Möglicherweise liegt ein saisonaler Einfluss auf die Nac-End-IRM-Freisetzung vor, jedoch muss ein Gewöhnungseffekt an die Testsituation oder an das Belastungsgerät ebenfalls mit in Betracht gezogen werden.

Belastung A / Belastung B

Unter additiver maximaler Ausbelastung (Belastung A) werden bei den Studenten nur in seltenen Fällen vor der Belastung oder 15 min nach Ende der Belastung Nac-End-IRM-Plasmakonzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze gefunden, während bei der isolierten Ausbelastung über 2 Minuten (Belastung B) erstmals bei allen 11 Studenten Konzentrationen bis maximal 5,6 pmol/l im Plasma gemessen werden. Wie bei den Standardbelastungen zeigen die Peptidkonzentrationen das gleiche Muster mit Konzentrationsabfall nach der Belastung und Konzentrationsanstieg 15 min Pause nach Ende der Belastung.

Es scheint, dass es schon im Vorfeld einer zu erwartenden Belastung mit unterschiedlichen Leistungsanforderungen und somit auch unterschiedlich hohem Stressfaktor zu einer Nac-End-IRM-Freisetzung kommt. In den ersten Monaten könnte die neue „Testsituation“ einen Stressfaktor darstellen, der zu einer Freisetzung von Nac-End-IRM führt. Im weiteren Verlauf gewöhnten sich die Probanden an die Belastungssituation und die präparative Freisetzung nahm ab. Belastung A unterschied sich möglicherweise für die Studenten im Vorfeld nicht von der Standardbelastung, erst mit der Erfahrung der maximalen Ausbelastung stieg der Stressfaktor vor Belastung B wieder an, die Nac-End-IRM-Freisetzung nahm zu.

Die Ergebnisse der Ruderer unter Belastung A und B weisen keine Unterschiede zu den Ergebnissen der Standardbelastungen auf. Da die Ruderer über mehrjährige Erfahrung in verschiedenen Testsituationen und Belastungen auf einem Ruderergometer verfügen, kann

davon ausgegangen werden, dass im Vorfeld weder die Standardbelastung noch Belastung A oder B eine besondere Stresssituation darstellen.

Somit scheint nicht unmittelbar die physische Belastungsintensität sondern der psychische Stress vor der Belastung Einfluss auf die Nac-End-IRM-Freisetzung auszuüben.

Dies entspricht auch den Ergebnissen der Studenten bei der isolierten psychischen Belastung (Prüfungssituation). Vor der Prüfung weisen die Hälfte der Studenten vergleichbar hohe Nac-End-IRM-Plasmakonzentrationen auf.

Trainingseffekt / Vergleich Studenten vs. Ruderer

Im Rahmen dieser Arbeit können keine Trainingseffekte auf die Freisetzung von Nac-End-IRM nachgewiesen werden.

Vergleicht man jedoch die untrainierten Studenten mit den Hochleistungsruderern bei den Standardbelastungen, so kann bei den Ruderern im Vorfeld der Belastung oder 15 min nach Ende der Belastung seltener Nac-End-IRM im Plasma nachgewiesen werden ($p=0,01$). Möglicherweise zeichnen sich hier die Effekte eines mehrjährigen Trainings ab. Zieht man andererseits in Betracht, dass der Unterschied zwischen den Wintermonaten und den Frühjahrsmonaten bei den Studenten möglicherweise ein „Gewöhnungseffekt“ an die Stresssituation darstellt, so könnte der signifikante Unterschied zwischen den beiden Gruppen auch auf den Kenntnissen des Belastungsgerätes und der Testsituation beruhen. Für diese These spricht die Tatsache, dass kein Unterschied zwischen den Gruppen in den Monaten 5 und 6 sowie unter Belastung A vorliegt.

6.2.4. β -MSH-IRM

Gegenstand vieler Studien war die Differenzierung und Funktion der fünf bisher bekannten Melanocortinrezeptoren. Es liegen uns jedoch zur Zeit keine Studien vor, die β -MSH im Plasma von Menschen nachweisen.

Standardbelastung

Unter der Standardbelastung wurden nur in Ausnahmefällen sowohl bei den Studenten als auch bei den Ruderern geringe Konzentrationen an β -MSH-IRM im Plasma nachgewiesen. Weder der physische noch der psychische Stress reichte aus, vor oder nach der Belastung eine Freisetzung dieses Peptids hervorzurufen. Mögliche saisonale Einflussfaktoren lassen sich somit unter Standardbelastung nicht zeigen.

Belastung A / Belastung B

Wird die Intensität der 30-minütigen Standardbelastung durch einen 2-minütigen Endspurt zur maximalen Ausbelastung gesteigert (Belastung A), kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Peptidkonzentrationen nach der Belastung auf durchschnittlich $13,9 \pm 11,4$ pmol/l bei den Studenten und $10,5 \pm 6,7$ pmol/l bei den Ruderern ($p=0,01$). Ein 2-minütiger Endspurt mit gleicher Leistung (P_{\max}) wie unter Belastung A aus einem körperlich ausgeruhtem Zustand (Belastung B) führt nur noch bei der Hälfte der Studenten zu einer Freisetzung an β -MSH-IRM mit signifikant geringeren Konzentrationen ($3,9 \pm 3,9$ pmol/l) ($p=0,05$). Bei den Ruderern kann unter Belastung B kein β -MSH im Plasma nachgewiesen werden.

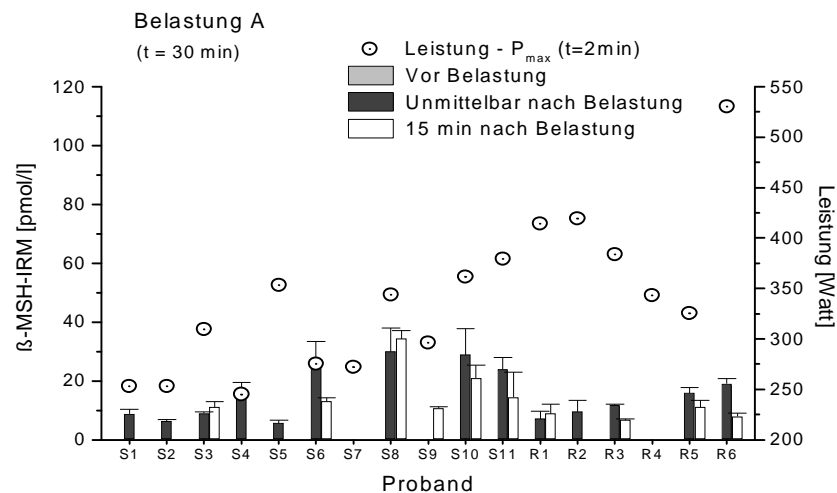


Abb. 6.2-5 Darstellung der Plasmakonzentrationen (mean \pm sd) von β -MSH-IRM [pmol/l] der Ruderer (R) und Studenten (S) im Zusammenhang mit der zugehörigen Maximalleistung (P_{\max}) [Watt] unter Belastung A (t = 28 + 2 min).

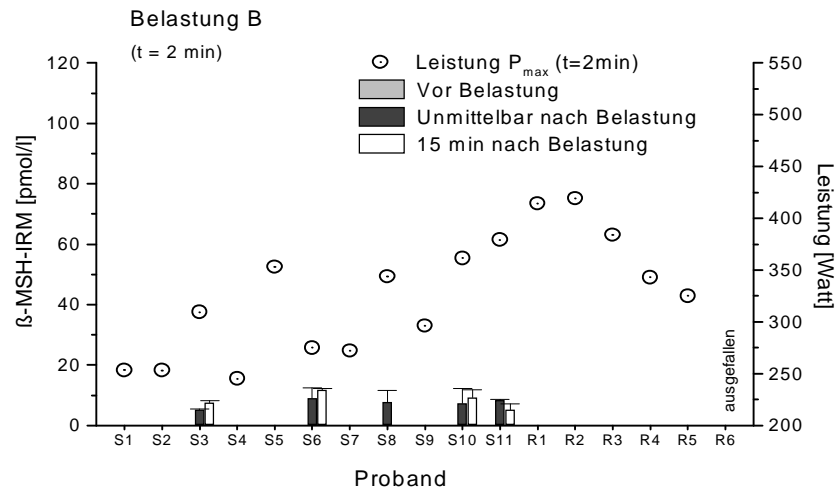


Abb. 6.2-6 Darstellung der Plasmakonzentrationen (mean \pm sd) von β -MSH-IRM [pmol/l] der Ruderer (R) und Studenten (S) im Zusammenhang mit der zugehörigen Maximalleistung (P_{max}) [Watt] unter Belastung B (t = 2 min) (R6 erkrankt ausgefallen).

Werden die drei verschiedenen Belastungsformen miteinander verglichen, so scheint bei den Studenten die Belastung B eine Zwischenstellung zwischen Standardbelastung und Belastung A einzunehmen, während sich bei den Ruderern kein Unterschied zwischen Belastung B und Standardbelastung beobachten lässt. 15 min nach Ende der Belastung fällt unter Belastung A die Peptidkonzentration in beiden Gruppen ab.

Die Ergebnisse zeigen, dass es in Abhängigkeit zur Intensität der Belastung zu einer Freisetzung von β -MSH-IRM in das Plasma kommt. Diese Freisetzung findet jedoch erst nach dem Überschreiten einer sehr hohen Belastungsschwelle statt.

Trainingseffekt / Vergleich Studenten vs. Ruderer

Da während der Standardbelastung kein β -MSH-IRM im Plasma der Ruderer nachgewiesen werden kann, ist es nicht möglich, den Einfluss von intensivem körperlichem Training über 6 Monate auf die Peptidfreisetzung zu erfassen.

Bei maximaler Ausbelastung liegen die β -MSH-IRM-Plasmakonzentrationen der Studenten um 7,2 pmol/l über denen der Ruderer. Bei Belastung B ließ sich bei den Ruderern im Gegensatz zu den Studenten kein β -MSH-IRM im Plasma nachweisen. Somit könnte intensives körperliches Training über einen langen Zeitraum bei vergleichbarer

Belastungsintensität zu einer verminderten Freisetzung von β -MSH-IRM nach körperlicher (Aus-) Belastung führen.

Dem Untersucher fiel hierbei ein Zusammenhang zwischen den höchsten β -MSH-IRM-Plasmakonzentrationen und den Erschöpfungszuständen der Studenten unmittelbar nach der Belastung und in der Folge auf.

6.2.5. Psychische Belastung

Zahlreiche Studien untersuchten den Einfluss psychischer Stressfaktoren auf die Freisetzung von POMC-Fragmenten beim Menschen. So führt „Public Speaking“ zu signifikanten Konzentrationsanstiegen von ACTH und β_H -Endorphin-IRM [Al'Absi et al. (2000); Miller et al. (1993); Sheps et al. (1995)]. Schedlowski et al. (1995) weisen erhöhte β_H -Endorphin-IRM-Plasmakonzentrationen nach Tandemfallschirmspringen nach, Hennig et al. (1994) beim „bungee jumping“, und in einer Studie von Leino et al. (1995) können bei angehenden Jet-Piloten nach einer Militärjet-Flugsimulation signifikante Anstiege an ACTH und β_H -Endorphin-IRM gezeigt werden. Singh et al. (1999) weist Konzentrationsanstiege von ACTH in einer Prüfungssituation nach und in einer Arbeit von Schulz (2003) können erhöhte Konzentrationen an ACTH, β_H -Endorphin-IRM und β_H -Endorphin (1-31) bei Skispringern (Skiflug) beobachtet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, in der Gruppe der Studenten den Einfluss einer psychischen Belastung, wie es eine Semesterabschlussprüfung darstellt, auf die POMC-Fragmentfreisetzung zu untersuchen. Beim Vergleich der Peptidkonzentrationen gilt zu beachten, dass die Blutabnahmen morgens um 9 Uhr (vor der Prüfung) und mittags um 12 Uhr (nach der Prüfung) stattfanden. In den Morgenstunden ist auf Grund des circadianen Rhythmus der ACTH-Freisetzung [Silbernagel et al. (2003)] und der β_H -Endorphin-IRM-Freisetzung [Dent et al. (1981)] mit physiologisch erhöhten Plasmakonzentrationen zu rechnen.

Die durchschnittliche ACTH-Plasmakonzentration liegt vor der Prüfung bei $17,9 \pm 13,5$ pmol/l und fällt nach der Prüfung auf $5,1 \pm 6,1$ pmol/l ($p=0,05$) ab (mean \pm sd) (ACTH-Normalbereich 8 Uhr: 1,1 bis 11 pmol/l). Diese erhöhten Plasmakonzentrationen vor der Testsituation entsprechen den Ergebnissen aus den Studien von Al'Absi et al. (2000) und Schulz (2003) sowie den Ergebnissen dieser Arbeit bei der Belastung B. Offensichtlich scheint der psychische Stressfaktor einer physischen Belastung der isolierten 2 Minuten Maximalbelastung bezüglich der ACTH-Freisetzung vergleichbar zu sein.

Die Peptidkonzentrationen von β_H -Endorphin-IRM und β_H -Endorphin (1-31) bei der psychischen Belastung sind vergleichbar mit den Arbeiten von Schulz (2003) und Schedlowski et al. (1995) und entsprechen den gemessenen Plasmakonzentrationen nach Belastung B. Im Gegensatz zu β_H -Endorphin-IRM, das nur bei einem Teil der Probanden im Plasma vorliegt, kann β_H -Endorphin (1-31) bei allen Probanden im Plasma nachgewiesen werden. Dabei kommt es zu einem Abfall der Peptidkonzentrationen nach der Prüfung.

Bei zwei Probanden können sowohl bei β_H -Endorphin-IRM als auch bei β_H -Endorphin (1-31) Plasmakonzentrationen von über 500 pmol/l im Vorfeld der Prüfung gemessen werden. Ursache für diese Extremwerte könnte zum einen die außerordentliche psychische Belastung sein, zum anderen könnten unbekannte Störfaktoren im Plasma der Probanden den Nachweis der Peptide beeinflusst haben.

Bei einem Teil der Probanden kann eine Freisetzung von Nac-End-IRM in der gleichen Größenordnung wie im Vorfeld der verschiedenen physischen Belastungen nachgewiesen werden. β -MSH scheint im Rahmen der psychischen Stresssituation eine untergeordnete Rolle zu spielen, hier konnte kein Befund oberhalb der Nachweisgrenze erhoben werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass psychischer Stress Einfluss auf die Freisetzung von ACTH, β_H -Endorphin-IRM, β_H -Endorphin (1-31) und N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM haben kann, während kein Einfluss auf β -MSH-IRM gefunden wird. Ähnliche Befunde wurden in den Arbeiten von Schulz (2003), Leino et al. (1995), Miller et al. (1993) und Sheps et al. (1995) beobachtet. Hierbei ist die POMC-Derivatfreisetzung unter psychischer Belastung vergleichbar mit der Peptidfreisetzung unter physischer Belastung bei Belastung B.

Diese Ergebnisse der psychischen Belastung stellen interessante Befunde für weitere Untersuchungen dar. Da die Probanden mit dieser Semesterabschlussprüfung das Studium abgeschlossen hatten und Tests und Blutabnahmen während des folgenden Examens aus verständlichen Gründen abgelehnt wurden, sollten diese Ergebnisse als Grundlage für neue weiterführende Studien dienen.

6.3. Stressspezifische Freisetzung von POMC-Derivaten

Viele Studien untersuchten die stressspezifische Freisetzung von ACTH, β_H -Endorphin-IRM und anderen POMC-Fragmenten. Jedoch ist es bisher nicht gelungen, das physiologische System „POMC“ zu entschlüsseln.

Standardbelastung

Bei der Standardbelastung kann eine erhöhte Freisetzung von ACTH, β_H -Endorphin-IRM, β_H -Endorphin (1-31) und N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM, jedoch kein β -MSH-IRM im Plasma der Probanden nachgewiesen werden. Diese Befunde werden in den Arbeiten von Farrel et al. (1987), Rahkila et al. (1988), Goldfarb et al. (1991), Kraemer RR et al. (1989) und Schulz (2003), soweit die Peptide untersucht wurden, bestätigt. Diese erhöhte Freisetzung der einzelnen Peptide kann teilweise vor der Belastung, nach der Belastung oder 15 min nach Ende der Belastung beobachtet werden. Farrel et al. (1987) zeigen nach der Belastung höhere ACTH-Konzentrationen als β_H -Endorphin-IRM-Konzentrationen, hingegen finden Rahkila et al. (1988) keine Unterschiede.

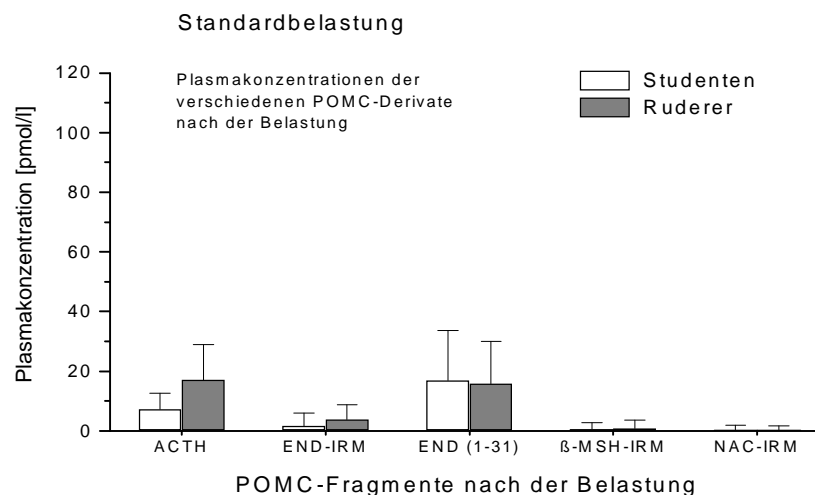


Abb. 6.3-1 Vergleich der POMC-Derivatkonzentrationen [pmol/l] (mean \pm sd) nach der Standardbelastung.

Belastung A

Werden die Probanden maximal ausbelastet (Belastung A), kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Plasmakonzentrationen von ACTH, β_H -Endorphin-IRM, β_H -Endorphin (1-31) und β -MSH-IRM. Diese Befunde werden in den Arbeiten von Farrel et al. (1987), Schwarz u. Kindermann (1990), Petraglia et al. (1988), Oleshansky et al. (1990), Heitkamp et al. (1993), (1996) und Schulz (2003) bestätigt. Auch in der vorliegenden Arbeit liegen, ähnlich wie in den Arbeiten von Farrell et al. (1987), Petraglia et al. (1988) und Schulz (2003), die ACTH-

Plasmakonzentrationen deutlich über den Konzentrationen der anderen gemessenen POMC-Derivate. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den Studien von Oleshansky et al. (1990), Heitkamp et al. (1993), (1996) und de Diego Acosta et al. (2001), die keine Konzentrationsunterschiede zwischen ACTH und β_{H} -Endorphin-IRM nachweisen.

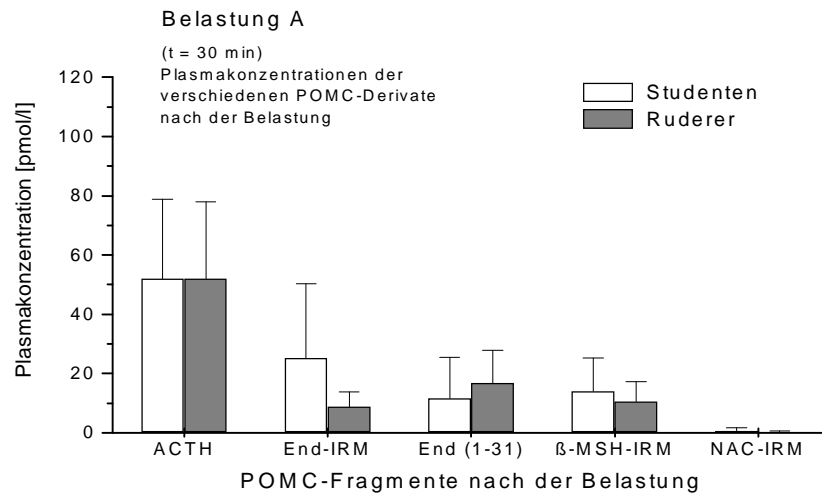


Abb. 6.3-2 Vergleich der durchschnittlichen POMC-Derivatkonzentrationen [pmol/l] (mean \pm sd) nach Belastung A.

Belastung B

Eine zweiminütige Maximalbelastung aus einem körperlich ausgeruhten Zustand führt bei einigen Probanden zu einer Freisetzung von ACTH, β_{H} -Endorphin-IRM, β_{H} -Endorphin (1-31) und β -MSH-IRM. Ähnliche Befunde werden in den Arbeiten von Schwarz u. Kindermann (1990), Krämer et al. (1991), Farrell et al. (1987), Petraglia et al. (1988) und Schulz (2003) beobachtet. Während bei den Ruderern signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen ACTH und β_{H} -Endorphin-IRM vorliegen, können bei den Studenten solche Unterschiede nicht beobachtet werden.

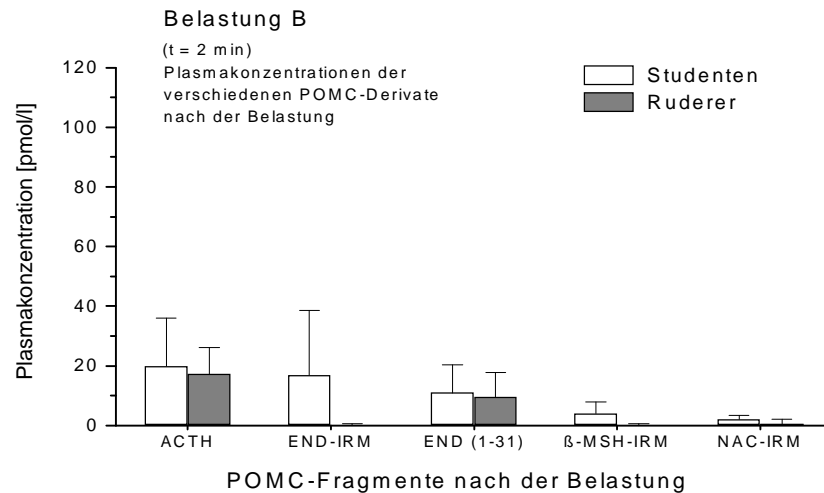


Abb. 6.3-3 Vergleich der durchschnittlichen POMC-Derivatkonzentrationen [pmol/l] (mean±sd) nach Belastung B.

Psychische Belastung

Im Vorfeld der in dieser Arbeit untersuchten psychischen Belastung im Rahmen einer Semesterabschlussprüfung werden deutlich erhöhte Plasmakonzentrationen von ACTH, β_H -Endorphin-IRM, β_H -Endorphin (1-31) und N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM gefunden. Diese Befunde werden in Arbeiten von Al'Absi et al. (2000), Miller et al. (1993), Sheps et al. (1995), Schedlowski et al. (1995), Leino et al. (1995), Hennig et al. (1994) und Schulz (2003) bestätigt. β -MSH-IRM wurde weder vor noch nach der psychischen Belastung nachgewiesen.

6.4 Schlussfolgerung

Physische und psychische Belastungsformen können zu einer POMC-Fragmentfreisetzung führen. Dabei können je nach Stresssituation die Höhe der Konzentrationen und der Zeitpunkt der Freisetzung für jedes Peptid variieren. So wie van Bergen et al. (1997) das Zusammenwirken von $\gamma 2$ -MSH und ACTH auf das kardiovaskuläre System beschrieben, könnten die verschiedenen Kombinationen der einzelnen POMC-Derivate im Plasma durch ihre „Gemeinschaftsaktion“ [Schulz (2003)] den Körper an bevorstehende oder bestehende Stressoren anpassen. Es ist denkbar, dass der menschliche Organismus auf Stress differenziert und der Situation angepasst reagieren kann, indem die Peptide einzeln und bedarfsgerecht freigesetzt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde weisen weder einen saisonalen Einfluss auf die Freisetzung der untersuchten Peptide im Plasma der Studenten nach, noch zeigt sich bei den Hochleistungsruderern ein Einfluss von intensivem Training über 6 Monate auf die Peptidfreisetzung. Der fehlende Trainingseffekt scheint im Widerspruch zu einer Arbeit von Heitkamp et al. (1998) zu stehen. Vergleicht man die Studenten mit den Ruderern, so zeigt sich, dass intensives Training über mehrere Jahre hinweg die Höhe der Peptidplasmakonzentrationen von ACTH, β_H -Endorphin-IRM, N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM und β -MSH-IRM zu beeinflussen scheint. Intensives Training „als chronischer Stressor“ könnte eine Adaptation des Organismus darstellen, die zu einer veränderten Peptidfreisetzung auch schon im Vorfeld einer Belastung führt, um eine gezielte Antwort auf den Stressor zu ermöglichen und somit den Organismus an die Stresssituation anzupassen. Die Hochleistungsruderer haben möglicherweise ein „Anpassungsniveau“, das ein „Plateau“ erreicht, bei dem durch intensives Training keine weitere messbare Adaptation der POMC-Derivatfreisetzung hervorgerufen werden kann.

Die folgenden Abbildungen stellen den Zusammenhang zwischen der POMC-Derivatfreisetzung nach der Belastung und der Belastungsintensität dar.

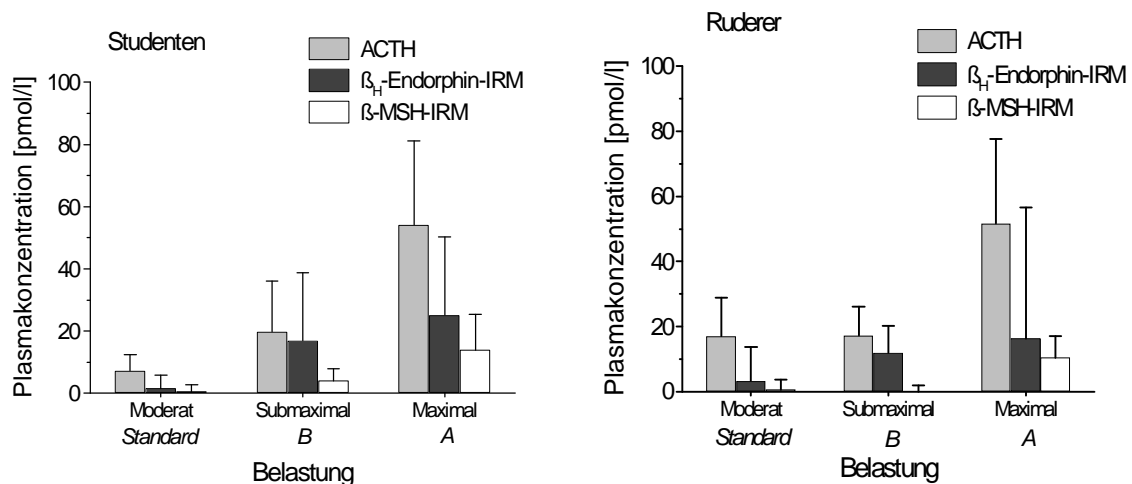


Abb. 6.4-1 Peptidkonzentrationen (mean \pm sd) von ACTH, β_H -Endorphin-IRM und β -MSH-IRM nach der Belastung der Studenten vs. Ruderer in Abhängigkeit von der Belastungsintensität.

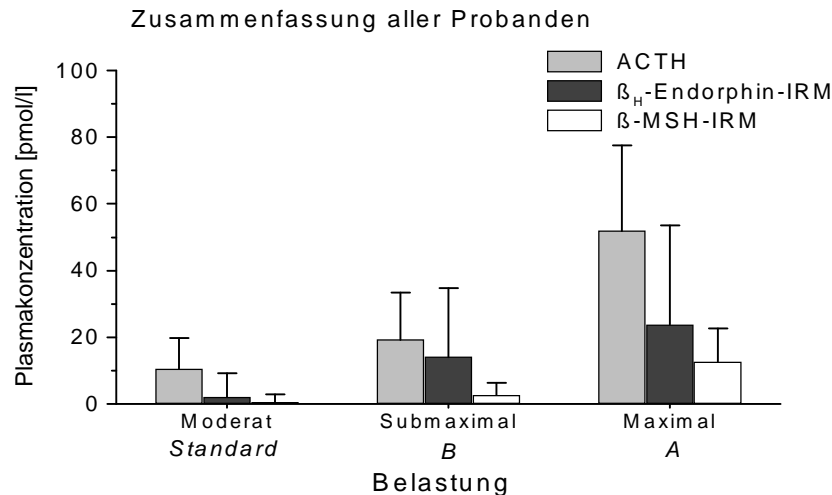


Abb. 6.4-2 Peptidkonzentrationen (mean \pm sd) von ACTH, β_{H} -Endorphin-IRM und β -MSH-IRM nach der Belastung (Ruderer und Studenten zusammengefasst) in Abhängigkeit von der Belastungsintensität.

Die POMC-Derivate ACTH, β_{H} -Endorphin-IRM und β -MSH-IRM scheinen je nach Belastungsintensität und Stresspotential gestaffelt und somit bedarfsgerecht in das Plasma freigesetzt zu werden.

Eine physische Belastung mit niedrigem Stresspotential führt zum isolierten Anstieg der ACTH-Plasmakonzentration nach der Belastung, während β_{H} -Endorphin-IRM und β -MSH-IRM im Plasma nicht oder nur in Ausnahmefällen in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden können. Es ist nur eine unmittelbare und kurzfristige „Stressantwort“ des Körpers nötig, die Freisetzung von ACTH alleine (mit einer Halbwertszeit von 3 min) ermöglichen könnte.

Bei Zunahme der Belastungsintensität findet man zum einen eine vermehrte Freisetzung von ACTH, zum anderen scheint nach Überschreiten eines gewissen Stresspotentials zusätzlich β_{H} -Endorphin-IRM in das Plasma freigesetzt zu werden. Es werden nun mehr Ressourcen des Körpers über einen längeren Zeitraum benötigt, die dem Körper möglicherweise durch Aktivierung von β_{H} -Endorphin-IRM mit einer Halbwertszeit von ca. 20 min als zweite Stufe zur Verfügung gestellt werden könnten.

Wird der Körper letztendlich einer maximalen Belastung ausgesetzt, die an die körperliche Belastbarkeitsgrenze führt, kann nach Überschreiten einer weiteren „Stresspotentialschwelle“ zusätzlich β -MSH-IRM in das Plasma freigesetzt werden. Im Plasma findet man nun erhöhte Konzentrationen an ACTH, β_{H} -Endorphin-IRM und auch β -MSH-IRM. β -MSH-IRM könnte

als „Reservepeptid“ bezeichnet werden, das den Körper befähigt, in extremen Erschöpfungszuständen weitere Reserven zu aktivieren, um Situationen mit höchstem Stresspotential zu begegnen.

β_H -Endorphin (1-31) lässt sich in dieses Stufenschema nicht eindeutig einordnen, da die Ergebnisse auf Grund der großen Streuung letztendlich nicht eindeutig interpretiert werden können. Die Unterschiede zwischen β_H -Endorphin-IRM und β_H -Endorphin (1-31) in der Höhe der Plasmakonzentrationen zeigt jedoch, dass das authentische β_H -Endorphin nicht mit dem immunoreaktivem Material gleichgesetzt werden kann [Schulz et al. (2000); Harbach et al. (2000)].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die POMC-Derivatausschüttung von der empfundenen körperlichen Belastungsintensität beeinflusst wird. So ist eine physische Belastung von beispielsweise 200 Watt auf einem Ruderergometer für einen trainierten Probanden weniger körperlich „belastend“ als für einen untrainierten. Entscheidend ist somit das „Stresspotential“, welches eine Belastungssituation auf den menschlichen Organismus ausübt und trotz vergleichbarer Leistung individuell unterschiedlich sein kann. Beim intraindividuellen Vergleich zeigt sich, dass eine identische Leistung für dieselbe Person zu verschiedenen Zeitpunkten eine unterschiedliche Belastungsintensität bzw. somit ein unterschiedliches „Stresspotential“ haben kann. Jeder Mensch kennt folgende Aussagen: „Heute fühle ich mich einfach nicht so fit“, oder „Heute ist mein Tag“. Exakt dieselbe physische Belastung kann an unterschiedlichen Tagen ebenso unterschiedlich empfunden werden. Das Stresspotential und somit auch die daraus resultierende POMC-Fragmentfreisetzung könnte folglich auch abhängig von dem rein subjektiven Empfinden sein, welches wiederum von vielen Faktoren wie Antrieb, Motivation, Erlebnissen, zukünftigen Aufgaben, Gedankengängen, sozialem Umfeld, usw. beeinflusst wird. Dies könnte auch eine mögliche Erklärung für die sich teilweise widersprechenden Ergebnisse sein.

Die erhöhten Plasmakonzentrationen von ACTH, β_H -Endorphin-IRM, N-acetyl- β -Endorphin-IRM aber auch β_H -Endorphin (1-31) im Vorfeld einzelner Belastungssituationen weisen darauf hin, dass sich schon vor einer Belastung präparative Veränderungen einstellen. Wenn POMC-Derivate eine Funktion eines „Stressadapters“ wahrnehmen, könnte durch die

präparative Freisetzung einzelner POMC-Derivate eine Art „Depot“ bereitgestellt oder eine „Stressbereitschaft“ hergestellt werden, die es dem Organismus ermöglicht, schneller und effektiver auf den anstehenden Stressor reagieren zu können. Vergleicht man die ACTH-Konzentrationen der Ruderer und Studenten, so scheint Training die Fähigkeit zur „präparativen“ Freisetzung zu erhöhen. Dies wäre gleichzeitig auch eine mögliche Erklärung für einzelne Beispiele, in denen es zu einem Abfall der β_H -Endorphin-IRM- und β_H -Endorphin (1-31)-Konzentration nach der Belastung kommt. Der Organismus erwartet eine Stresssituation, es kommt schon im Vorfeld der anstehenden Belastung zu einer Konzentrationserhöhung einzelner POMC-Derivate; die Belastung selbst erfordert möglicherweise durch ihr zu geringes Stresspotential keine weitere Peptidfreisetzung, die Peptidkonzentrationen fallen also schon während der Belastung wieder ab.

Eine wichtige Komponente könnte im Vorfeld der zu erwartenden physischen Belastung auch die psychische Belastung spielen. Diese Arbeit weist, ähnlich den Arbeiten von Schulz (2003) und Schedlowski et al. (1995), die Freisetzung von ACTH, β_H -Endorphin-IRM, β_H -Endorphin (1-31) und N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM in das Plasma vor einer psychischen Stresssituation nach. Somit findet eine „präparative Stressbereitschaft“ nicht nur in Hinblick auf eine physische sondern auch auf psychische Belastung statt. Dies könnte auch eine Erklärung für die erhöhten Peptidkonzentrationen der Studenten im ersten Monat der Standardbelastung sein. Die Belastungs- und Testsituation war für diese Probanden neu und stellte somit ein erhöhtes psychisches Stresspotential dar.

N-Acetyl- β -Endorphin-IRM zeigt im Vergleich zu den anderen untersuchten POMC-Fragmenten eine Besonderheit: Im Vorfeld der Belastung kann die Peptidkonzentration erhöht sein, jedoch fällt sie nach der Belastung wieder ab. Dieses zeigt sich bei allen hier untersuchten Belastungsformen. Selbst bei maximaler Ausbelastung wird nach der Belastung kein Konzentrationsanstieg nachgewiesen. Hieraus ließe sich schlussfolgern, dass Nac-End-IRM nicht zur eigentlichen Stressadaptation durch Aktivierung von körperlichen Reserven eingesetzt wird, sondern vornehmlich der präparativen Stressbereitschaft dient. Eine mögliche Erklärung bestünde darin, dass N-actyl- β -Endorphin-IRM und β_H -Endorphin-IRM als funktionelle Antagonisten fungieren [Tsujii et al. (1989); Ellerkmann et al. (1993)]. Im Vorfeld einer zu erwartenden Belastung wird neben ACTH auch β_H -Endorphin-IRM in das Plasma ausgeschüttet. Um eine verfrühte Wirkung des β_H -Endorphin-IRM zu verhindern, könnte Nac-End-IRM als acetylierte Form freigesetzt werden. In der akuten Stresssituation

steigt die Konzentration an β_H -Endorphin-IRM. Nach der Stresssituation steigt in der Erholungsphase die Plasmakonzentration von Nac-End-IRM wieder an, um möglicherweise die nun überschießende Aktivierung durch β_H -Endorphin-IRM, dessen Plasmakonzentration parallel hierzu abfällt, zu beenden. Auf welche Art und in welcher Form Nac-End-IRM als funktioneller Antagonist zu β_H -Endorphin-IRM fungiert bleibt unklar, da bisher nicht nachgewiesen werden konnte, dass Nac-End-IRM an Opioidrezeptoren sich binden kann.

Während der eigentlichen Belastungssituation könnte Nac-End-IRM gleichzeitig als eine Art „Endorphinspeicher“ fungieren. N-Acteyl- β -Endorphin-IRM als inaktive Vorform könnte in der akuten Stresssituation deacetyliert werden und stünde als aktive β -Endorphin-Form zur Verfügung.

Die folgende Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der POMC-Derivatfreisetzung aus der Hypophyse bei physischem und psychischem Stress:

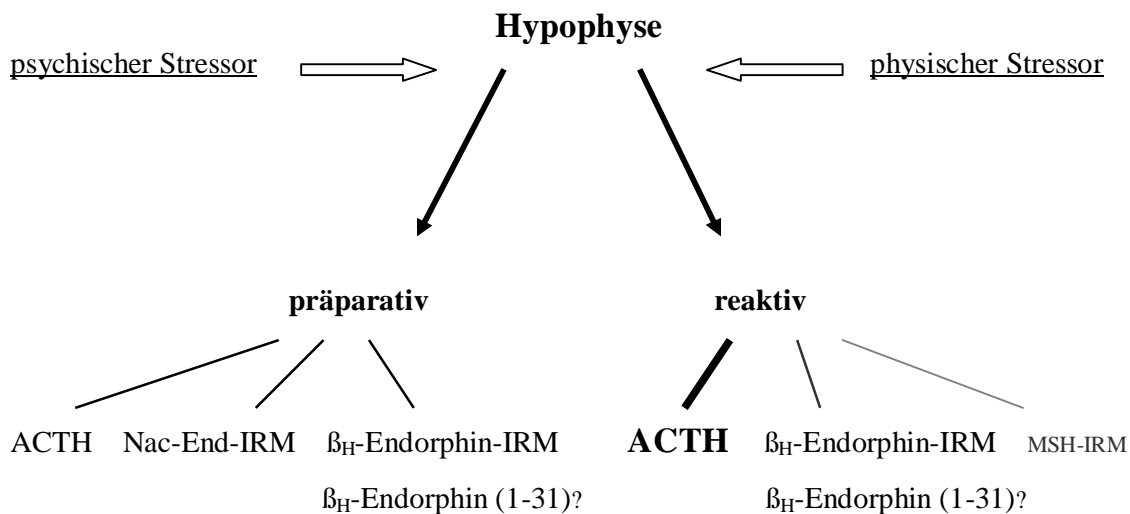


Abb. 6.4-3 Schematische Darstellung der POMC-Derivatfreisetzung bei physischem und psychischem Stress. Die unterschiedliche Schriftgröße der Peptide soll die unterschiedliche Höhe der Plasmakonzentrationen widerspiegeln. Präparativ können die Peptide in vergleichbaren Konzentrationen vorliegen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass POMC-Derivate einen essentiellen und komplexen Bestandteil des menschlichen Stresssystems darstellen, welches auf bisher unbekannte Weise Funktionen des Organismus in Stresssituationen beeinflusst.

7. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 11 untrainierte Studenten und 6 trainierte Hochleistungsruderer über einen Zeitraum von 11 Monaten untersucht. Hierbei wurden die Probanden einer sich wiederholenden Belastung, einer Ausbelastung und einer submaximalen Belastung ausgesetzt. Neben den POMC-Fragmenten ACTH und β_H -Endorphin-IRM wurden in dieser Arbeit zusätzlich authentisches β_H -Endorphin (1-31), N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM sowie β -MSH-IRM untersucht. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von intensivem körperlichem Training auf die Freisetzung dieser POMC-Derivate unter Ausschluss saisonaler Einflussfaktoren zu erfassen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen weder einen saisonalen Einfluss auf die jeweilige Peptidfreisetzung nach, noch konnte bei den Hochleistungsruderern ein Trainingseffekt über einen Zeitraum von 6 Monaten beobachtet werden. Der Vergleich der Studenten mit den Ruderern zeigt jedoch, dass intensives Training über mehrere Jahre zu einer gesteigerten Freisetzung an β_H -Endorphin-IRM unter moderater Belastung führt.

Bei einem physischen „Stressor“ werden die Fragmente ACTH, β_H -Endorphin-IRM, möglicherweise auch β_H -Endorphin (1-31) sowie β -MSH-IRM mit steigender Belastung gestaffelt und in unterschiedlichen, der Situation und dem Bedarf angepassten Verhältnissen, als mögliche Stressadaptation des Organismus, freigesetzt. Dabei zeigt sich, dass β -MSH-IRM nur bei maximaler Ausbelastung, möglicher Weise als „Reservepeptid“ im Plasma nachweisbar ist. Es könnte den Körper befähigen, bei extremen Erschöpfungszuständen weitere Reserven zu aktivieren, um Situationen mit höchstem Stresspotential zu begegnen. Eine Aktivierung dieses Stressadaptationssystem findet jedoch nicht erst mit Beginn der physischen Belastung statt, sondern schon im Vorfeld kann es zu einer Freisetzung von ACTH, β_H -Endorphin-IRM und authentischem β_H -Endorphin (1-31) sowie N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM kommen. Diese POMC-Derivatfreisetzung könnte als „präparative Bereitschaftsreaktion“ interpretiert werden, die den Körper auf die bevorstehende Belastung „vorbereitet“. Hierbei scheint N-Acetyl- β_H -Endorphin-IRM eine wichtige Rolle zu spielen, da dieses POMC-Fragment nur vor einer Belastung oder in der Ruhephase 15 min nach einer Belastung im Plasma nachweisbar ist und somit offensichtlich nicht zur eigentlichen Stressadaptation während einer physischen Belastung durch „Aktivierung von körperlichen Reserven“ eingesetzt wird.

Diese Arbeit legt den Schluss nahe, dass das komplexe Zusammenspiel und die Mannigfaltigkeit der Kombinationen der POMC-Derivate es dem Körper ermöglicht, auf die unterschiedlichsten Stresssituationen spezifisch reagieren zu können.

8. Literatur

1. Al'Absi M, Bongard S, Lovallo WR. Adrenocorticotropin responses to interpersonal stress: effects of over anger expression style and defensiveness. *Int J of Psychophysiology* 2000; 37: 257 - 265
2. Aleem FA, Omar RA, elTabbakh GH. Immunoreactive beta-endorphin in human ovaries. *Fertil Steril* 1986; 45(4): 507-511
3. Appleyard SM, Hayward M, Young JI, Butler AA, Cone RD, Rubinstein M, Low MJ. A role for the endogenous opioid beta-endorphin in energy homeostasis. *Endocrinology* 2003; 144(5): 1753 - 1760
4. Balm PH, Pottinger TG. Corticotrope and melanotrope POMC-derived peptides in relation to interrenal function during stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol.* 1995; 98(3):279 -288
5. Beneke R. Anaerobic threshold, individual anaerobic threshold, and maximal lactate steady state in rowing. *Med Sci Sports Exerc.* 1995; 27(6):863 - 867
6. Bernstein HG, Krell D, Emrich HM, Baumann B, Danos P, Diekmann S, Bogerts B. Fewer beta-endorphin expressing arcuate nucleus neurons and reduced beta-endorphinergic innervation of paraventricular neurons in schizophrenics and patients with depression. *Cell Mol Biol* 2002; 48: 259 - 265
7. Bertagna, X. Proopiomelanocortin-derived peptides. *Endocrinol. Metabol. Clin. North America.* 1994; 23: 467 – 485
8. Boscatto LM, Stuart MC. Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays. *Clin Chem.* 1986; 32(8):1491 - 1495
9. Carr DB, Bullen Ba, Skrinar GS, Anold MA, Rosenblatt M, Eitins IZ, Marins JB, McArthur JW. Physical conditioning facilitates the exercise-induced secretion of beta-endorphin and betalipotropin in women. *N Engl J Med* 1981; 305: 560 - 563

10. Castellani JW, Young AJ, Stulz DA, DeGroot DW, Blanchard LA, Staab JE, Sawka MN. Pituitary-adrenal and pituitary-thyroid hormone responses during exercise-cold exposure after 7 days of exhaustive exercise. *Aviat Space Environ Med.* 2002;73(6): 544 - 550
11. Castro MG, Morrison E. Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain. *Crit Rev Neurobiol* 1997; 11: 35-57
12. Chan EC, Smith R. Beta-endorphin immunoreactivity during human pregnancy. *J Clin Endocrinol metab* 1992; 75: 1453 - 1458
13. Chennaoui M, Gomez Merino D, Lesage J, Drogou C, Guezennec CY. Effects of moderate and intensive training on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in rats. *Acta Physiol Scand.* 2002;175(2):113 - 121
14. Chrousos GP. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann NY Acad Sci* 1998; 851: 311-335
15. Chrousos GP, Tsigos C. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* 2002; 53:865-71
16. Colt EWD, Wardlaw SL, Franz AG. The effect of running on plasma β -endorphin. *Life Sci* 1981; 28: 1637 - 1640
17. Cork RC, Allen D, Finley JH. Effects of an intense 12-week training program on beta-endorphin levels in college-age men. *Med. Sci Sports Exerc* 1985; 17: 235 - 236
18. Cumming DC, Wheeler GD. Opioids in exercise physiology. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 1987; 5: 171 – 179
19. De Diego Acosta AM, Garcia JC, Fernandez-Pastor VJ, Peran S, Ruiz M, Guirado F. Influence of fitness on the integrated neuroendocrine response to aerobic exercise until exhaustion. *Physiol Biochem.* 2001;57(4): 313 - 320
20. Dent RR, Guilleminault C, Albert LH, Posner BI, Cox BM, Goldstein A. Diurnal rhythm of plasma immunoreactive beta-endorphin and its relationship to sleep stages and plasma rhythms of cortisol and prolactin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981 May;52(5):942 - 947

21. Di Prampero PE, Cortili G, Celentano F, Cerretelli P. Physiological aspects of rowing. *J Appl Physiol.* 1971; 31(6): 853 - 857
22. Droste C, Greenlee MW, Schreck M, Roskamm H. Experimental pain thresholds and plasma beta-endorphin levels during exercise. *Medicine and Science in sports and exercise* 1991; 23: 334-344
23. Elias AN, Fairshter R, Pandian MR, Domurat W, Kayaleh R. β -Endorphin / β -lipotropin release and gonadotropin secretion after acute exercise in physically conditioned males. *Eur J Appl Physiol* 1989; 58: 522 – 527
24. Ellerkmann E, Kineman RD, Porter TE, Frawley LS. De-acetylated variants of alpha-melanocyte-stimulating hormone and beta-endorphin can antagonize the mammotrope-recruiting activity of their acetylated forms. *J Endocrinol.* 1993 Nov;139(2):295-300.
25. Engfred K, Kjaer M, Secher NH, Friedman DB, Hanel B, Nielsen OJ, Bach FW, Galbo H, Levine BD. Hypoxia and training-induced adaptation of hormonal responses to exercise in humans. *Eur J Appl Physiol* 1994; 68: 303 – 309
26. Evans AAL, Khan S, Smith ME. Evidence for a hormonal action of β -endorphin to increase glucose uptake in resting and contracting skeletal muscle. *J of Endocrinology* 1997; 155: 387 - 392
27. Evans VR, Manning AB, Bernard LH, Chronwall BM, Millington WR. Alpha-melanocyte-stimulating hormone and N-acetyl-beta-endorphin immunoreactivities are localized in the human pituitary but are not restricted to the zona intermedia. *Endocrinology* 1994; 34(1):97 -1 06.
28. Farrell PA, Kjaer M, Bach FW, Galbo H. Beta-endorphin and adrenocorticotropin response to supramaximal treadmill exercise in trained and untrained males. *Atca Physiol Scand* 1987; 130: 619 – 625
29. Fry AC, Kraemer WJ. Resistance Exercise Overtraining and Overreaching. *Sports Med* 1997; 23(2): 106 - 129
30. Ganong WF, Dallman MF, Roberts JL. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Revisited. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1987; 512: 1 - 504

31. Gibson S, Crosby SR, White A. Discrimination between β -endorphin and β -lipotropin in human plasma using two-site immunoradiometric assays. *Clin Endocrinol* 1993; 39: 445 - 453
32. Goldfarb AH, Hatfield BD, Potts J, Armstrong D. Beta-Endorphin Time Course Response to Intensity of Exercise: Effect of Training status. *Int. J. Sports Med.* 1991; 12: 264 - 268
33. Goldfarb AH, Jamurtas AZ. β -Endorphin Response to Exercise – An Update. *Sports Med.* 1997; 24: 8 . 16
34. Gomez-Merino D, Chennaoui M, Drogou C, Bonneau D, Guezennec CY. Decrease in serum leptin after prolonged physical activity in men. *Med Sci Sports Exerc* 2002; 34(10): 594 - 1599
35. Gramsch CH, Meo T, Riethmüller G, Herz A. Binding characteristics of a monoclonal β -endorphin antibody recognizing the N-terminus of opioid peptides. *J.Neurochem.* 1983; 40, 1220 - 1226
36. Guillemin R, Ling N, Lazarus L, Burgus R, Minick S, Bloom F, Nicoll R, Siggins G, Segal D. The endorphins, novel peptides of brain and hypophysial origin, with opiate-like activity: biochemical and biologic studies. *Ann N Y Acad Sci.* 1977; 297: 131 - 157
37. Hahn von Dorsche H, Falt K, Zuhlke H. The beta-endorphinergic innervation of the pancreas of humans and rats. *Anat Anz* 1990; 170(5): 373 - 375
38. Hale KD, Weigent DA, Gauthier DK, Hiramoto RN, Ghanta VK. Cytokine and hormone profiles in mice subjected to handling combined with rectal temperature measurement stress and handling only stress. *Life Sci.* 2003; 72(13): 1495 - 14508
39. Harbach H, Hell K, Gramsch Ch, Katz N, Hempelmann G, Teschemacher H. β -endorphin (1-31) in the plasma of male volunteers undergoing physical exercise. *Psychoneuroendocrinology* 25, 2000; 551 - 562
40. Heck H, Mader A, Hess G, Mucke S, Muller R, Hollmann W. Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. *Int J Sports Med.* 1985; 6(3): 117 - 130

41. Heinzmann RH, Döller PC, Kropp S, Bleich S. Kurzlehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie und Immunologie. Schattauer New York 1997; 282 - 284
42. Heitkamp H-C, Schmidt K, Scheib K. β -Endorphin and adrenocorticotrophic hormone production during marathon and incremental exercise. Eur J Appl Physiol 1993; 66: 269 – 274
43. Heitkamp H-C, Schulz H, Röcker K, Dickhuth H-H. Endurance Training in Females: Changes in β -Endorphin and ACTH. Int J Sports Med 1998; 19: 260 - 264
44. Hennig J, Laschefski U, Opper C. Biopsychological changes after bungee jumping: beta-endorphin immunoreactivity as a mediator of euphoria? Neuropsychobiology 1994; 29(1): 28 - 32
45. Hildebrand A, Preissner KT, Müller-Berghaus G, Teschemacher H. A novel β -endorphin binding protein. Complement S protein (=vitronectin) exhibits specific non-opioid binding sites for β -endorphin upon interaction with heparin or surfaces. J Biol Chem 1989; 264: 15429 – 15434
46. Hoffmann P, Jonsdottir IH, Thorén P. Activation of Different Opioid Systems by Muscle Activity and Exercise. News Physiol. Sci. 1996; 11: 223-228
47. Höllt V. Opioid peptide processing and receptor selectivity. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1986; 26: 59 – 77
48. Höllt V. Regulation of opioid peptide gene expression. In: Herz A, Akil H, Simon EJ, Hrsg. Handb Exp Pharm 104/I (Opioids I). Berlin: Springer; 1993. p.307-346
49. Howlett TA, Tomlin S, Nghafoong L et al. Release of β -endorphin and met-enkephalin during exercise in women: response to training. BMJ 1984; 288: 1950-1952
50. Hunter WM, Greenwood FC. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature. 1962; 194: 495 - 496
51. Inder WJ, Hellemans J, Swanney MP, Prickett TCR, Donald RA. Prolonged exercise increases peripheral plasma ACTH, CRH, and AVP in male athletes. App J Physiology 1998; 836 - 841

52. Jacobs I. Blood Lactate Implications for Training and Sports Performance. Sports Med. 1986; 3: 10 - 25
53. Jamurtas AZ, Goldfarb AH, Chung S-C, Hegde S, Marino C, Fatouros IG. Beta-endorphin infusion during exercise in rats does not alter hepatic or muscle glycogen. J of Sports Sciences; 2001; 19: 931-935
54. Knigge KM, Joseph SA. Anatomy of the opioid systems of the brain. Can J Neurol Sci 1984; 11: 14-23
55. Kraemer RR, Blair S, Kraemer GR, Castracane VD. Effects of treadmill running on plasma beta-endorphin, corticotropin and cortisol levels in male and female 10K runners. J Appl Physiol 1989; 36: 845 - 8851
56. Kraemer RR, Acevedo EO, Dziewaltowski D, Kilgore JL, Kraemer GR, Castrancane VD. Effects of Low-Volume Resistive Exercise on Beta-Endorphin and Cortisol Concentrations. Int. J. Sports Med. 1996; 17: 12-16
57. Kraemer WJ, Fleck SJ, Callister R, et al. Training responses of plasma beta-endorphin, adrenocorticotropin, and cortisol. Med Sci Sports Exerc 1989; 21: 146 - 153
58. Kreutzig T. Biochemie 11. aktualisierte Aufl. G. Fischer Lübeck / Stuttgart / Jena / Ulm 2002; 255-256
59. Langenfeld ME, Hart LS, Kao PC. Plasma β -endorphin responses to one-hour bicycling and running at 60% $\text{VO}_{2\text{max}}$. Medicine and Science in Sports and Exercise 1987; 19: 83 - 86
60. Leino T, Leppaluoto J, Huttunen P, Ruokonen A, Kuronen P. Neuroendocrine responses to real and simulated BA Hawk MK 51 flight. Aviat Space Environ Med. 1995 Feb; 66(2): 108 -113
61. Li CH. β -Endorphin: a pituitary peptide with potent morphine-like reactivity. Archives of Biochemistry and Biophysics 1977; 183: 595
62. Lobstein DB, Ismail AH. Decreases in resting plasma beta-endorphin / lipotropin after endurance training. Med Sci Sports Exerc 1989; 19: 161 - 166

63. Lobstein DB, Rasmussen CL. Decreases in resting plasma beta-endorphin and depression scores after endurance training. *J Sports Med Phys Fitness* 1991; 31(4): 543 - 545
64. Luger A, Deuster PA, Kyle SB, Gallucci WT, Montgomery LC, Gold PW, Loriaux DL, Chrousos GP. Acute Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to the Stress of Treadmill Exercise. *New Eng J Med* 1987; 316 (21): 1309 - 1315
65. Malarkey WB, Pearl DK, Demers LM, Kiecolt-Glaser JK, Glaser R. Influence of academic stress and season on 24-hour mean concentration of ACTH, Cortisol, and β -Endorphin. *Psychoneuroendocr* 1995; 20 (5): 499 - 508
66. Matejec R. Fragmente des Proopiomelanocortins in Blutplasma und Liquor cerebrospinalis präoperativ, unter Spinalanästhesie sowie unter postoperativer Schmerzbelastung. Dissertation Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2002
67. Matejec R, Ruwoldt R, Bodeker RH, Hempelmann G, Teschemacher H. Release of beta-endorphin immunoreactive material under perioperative conditions into blood or cerebrospinal fluid: significance for postoperative pain? *Anesth Analg* 2003; 96(2): 481 - 486
68. Marriott HE, Lamb KL. The use of ratings of perceived exertion for regulating exercise levels in rowing ergometry. *Eur J Appl Physiol* 1996; 72: 267 - 271
69. McLoughlin L, Evans SF, Watson JD, Hinds CJ, Rees LH. Characterization of circulating pro-opiomelanocortin-related peptides in human septic shock. *J Endocrinol* 1988; 119: 159 – 165
70. McLoughlin L, Medbak S, Grossman AB. Circulating opioids in man. In: Herz A, Akil H, Simon EJ, (eds). *Handbook of Experimental Pharmacology 104/II (Opioids II)*. Berlin: Springer, 1993: 673 – 696
71. Meyers Grosses Taschenlexikon in 24 Bänden. In: Digel W, Kwiatkowski G, Grill G, Hrsg. *Meyers Lexikonredaktion 3. aktualisierte Auflage Band 24*. B.I. Taschenbuchverlag Mannheim / Wien / Zürich 1990; 182

72. Miller PF, Light KC, Bragdon EE, Ballenger MN, Herbst MC, Maixner W, Hinderliter AL, Atkinson SS, Koch GG, Sheps DS. Beta-endorphin response to exercise and mental stress in patients with ischemic heart disease. *J Psychosom Res.* 1993 Jul;37(5):455 - 465
73. Millington WR, Rosenthal DW, Unal CB, Nyquist-Battie C. Localization of pro-opiomelanocortin mRNA transcripts and peptide immunoreactivity in rat heart. *Cardiovasc Res.* 1999; 43(1):107 - 116
74. Mizoguchi H, Wu HE, Narita M, Hall FS, Sora I, Uhl GR, Nagase H, Tseng LF. Antagonistic property of buprenorphine for putative epsilon-opioid receptor-mediated G-protein activation by beta-endorphin in pons/medulla of the mu-opioid receptor knockout mouse. *Neuroscience* 2002; 115(3): 715 721
75. Nakai Y, Nakao K, Oki S, Imura H, Li CH. Presence of immunoreactive beta-endorphin in plasma of patients with Nelson's syndrome and Addison's disease. *Life Sci* 1987; 23(23): 2293 - 2298
76. Oleshansky MA, Zoltick JM, Herman RH, Mougey EH, Meyerhoff JL. The influence of fitness on neuroendocrine responses to exhaustive treadmill exercise. *Eur J Appl Physio* 1990; 59: 405 – 410
77. Peijie C, Hongwu L, Fengpeng X, Jie R, Jie Z. Heavy load exercise induced dysfunction of immunity and neuroendocrine responses in rats. *Life Sci.* 2003; 72(20) 2255 – 2262
78. Petraglia F, Barletta C, Facchinetti F, Spinazzola F, Monzani A, Scavo D, Genazzani AR. Response of circulating adrenocorticotropin, beta-endorphin, beta-lipotropin and cortisol to athletic competition. *Acta Endocrinol (Copenh.)* 1988; 118: 332 – 336
79. Petrides JS, Deuster PA, Müller GP. Lactic Acid Does Not Directly Activate Hypothalamic-Pituitary Corticotroph Function. *Exp. Biology and Medicine* 1998; 220: 100 – 105
80. Pierce EF, Eastman NW, McGowen RW, et al. Resistance exercise decreases beta-endorphin immunoreactivity. *Br J Sports Med* 1993; 11: 499 - 502

81. Rahkila P, Hakala E, Alén M, Salminen K, Laatikainen T. β -endorphin and corticotropin release is dependent on a threshold intensity of running exercise in male endurance athletes. *Life Sci* 1988; 43: 551 – 558
82. Rotllant J, Balm PH, Ruane NM, Perez-Sanchez J, Wendelaar-Bonga SE, Tort L. Pituitary Proopiomelanocortin-Derived Peptides and Hypothalamus-Pituitary-Interrenal Axis Activity in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) during Prolonged Crowding Stress: Differential Regulation of Adrenocorticotropin Hormone and α -Melanocyte-Stimulating Hormone Release by Corticotropin-Releasing Hormone and Thyrotropin-Releasing Hormone. *Gen Comp Endocrinol* 2000; 119: 152 - 163
83. Rotllant J, Balm PH, Perez-Sanchez J, Wendelaar-Bonga SE, Tort L. Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. *Gen Comp Endocrinol* 2001; 121(3):333 – 42
84. Sanchez-Blazquez P, Garzon J. Further characterization of alpha N-acetyl-beta-endorphin-(1-31) regulatory activity, I: Effect on opioid- and alpha 2-mediated supraspinal antinociception in mice. *Life Sci.* 1992; 50(26):2083 - 2097
85. Sanchez-Blazquez P, Garzon J. N-acetyl-beta-endorphin-(1-31) and substance P regulate the supraspinal antinociception mediated by mu opioid and alpha-2 adrenoceptors but not by delta opioid receptors in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993; 265(2):835 - 843
86. Sanchez-Blazquez P, Garzon J. alpha N-acetyl-beta-endorphin-(1-31) disrupts the diminishing effect of mastoparan on opioid- and clonidine-evoked supraspinal antinociception in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 273(2):787 - 792
87. Schedlowski M, Flüge Th, Richter St, Tewes U, Sschmidt RE, Wagner ThOF. β -Endorphin, but not substance-P, is increased by acute stress in humans. *Psychoneuroendocrinology* 1995; 103 - 110
88. Schulz A, Harbach H, Katz N, Geiger L, Teschemacher H. β -Endorphin Immunoreactive Material and Authentic β -Endorphin in the Plasma of Males Undergoing Anaerobic Exercise on a Rowing Ergometer. *Int J Sports Med* 2000; 21: 513-517

89. Schulz A. Stressspezifische Freisetzung von β -Endorphin (1-31), ACTH und β -Endorphin-immunoreaktivem Material bei verschiedenen sportlichen Belastungssituationen. Dissertation Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2003
90. Schwarz L, Kindermann W. β -endorphin, adrenocorticotrophic hormone, cortisol and catecholamines during aerobic and anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* 1990; 59: 165 – 171
91. Schwarz L, Kindermann W. Changes in β -endorphin levels in response to aerobic and anaerobic exercise. *Sports Med* 1992; 13: 25 – 36
92. Sforzo GA. Opioids and Exercise. An Update. *Sports Medicine* 1988; 7: 109-124
93. Sheps DS, Ballenger MN, De Gent GE, Krittayaphong R, Dittman E, Maixner W, McCartney W, Golden RN, Koch G, Light KC. Psychophysical responses to a speech stressor: correlation of plasma beta-endorphin levels at rest and after psychological stress with thermally measured pain threshold in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1995 Jun;25(7):1499-503
94. Silbernagl S, Klinke R. Lehrbuch der Physiologie. 4., aktualisierte Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart / New York 2003; 465-468
95. Silva RM, Grossman HC, Rossi GC, Pasternak GW, Bodnar RJ. Pharmacological characterization of beta-endorphin and dynorphin A(1-17)-induced feeding using G-protein alpha-subunit antisense probes in rats. *Peptides* 2002; 23(6) 1101 - 1106
96. Singh A, Petrides JS, Gold PW, Chrousos GP, Deuster PA. Differential hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity to psychological and physical stress. *Endocrinol Metab*. 1999; 84(6):1944 - 1948
97. Stein C. Opioid analgesia at peripheral sites. In: Almedia OFX, Shippenberg TS, editors. *Neurobiology of opioids*. Berlin Springer Verlag; 1991; 273-285
98. Steinacker JM, Lormes W, Lehmann M, Altenburg D. Training of rowers before world championships. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 1997; 1158 – 1163

99. Steveson TC, Dores RM. POMC-related products in the intermediate pituitary of the amphibian, *Bufo marinus*: differential subcellular processing in the Golgi and secretory granules. *Peptides* 1996; 17(3):425 - 34
100. Tabata I, Atomi Y, Mutoh Y, Miyashita M. Effect of physical training on the responses of serum adrenocorticotrophic hormone during prolonged exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1990; 61(3-4): 188 - 192
101. Taylor DV, Boyajian JG, James N, Woods D, Chicz-Dement A, Wilson AF, Sandmann CA. Acidosis stimulates β -endorphin release during exercise. *J Appl Physiol* 1994; 77: 1913 – 1918
102. Tseng LF. Evidence for epsilon-opioid receptor-mediated beta-endorphin-induced analgesia. *Trends Pharmacol Sci.* 2001; 22(12): 623 - 630
103. Tsujii S, Bray GA. Acetylation alters the feeding response to MSH and beta-endorphin. *Brain Res Bull.* 1989; 23(3):165 - 169
104. Urhausen A, Coen B, Weiler B, Kindermann W. Individual Anaerobic Threshold and Maximum Lactate Steady State. *Int. J. Sports Med.* 1993; 14: 134 – 139
105. Urhausen A, Gabriel H, Kindermann W. Blood hormones as Markers of Training Stress and Overtraining. *Sports Med* 1995; 20(4): 251 - 276
106. Van Bergen P, Kleijne JA, De Wildt DJ, Versteeg DH. Different cardiovascular profiles of three melanocortins in conscious rats; evidence for antagonism between gamma 2-MSH und ACTH-(1-24). *Br J Pharmacol.* 1997; 120(8): 1561 - 1567
107. Van den Burg EH, Metz JR, Ross HA, Darras VM, Wendelaar Bonga SE, Flik. Temperature-induced changes in thyrotropin-releasing hormone sensitivity in carp melanotropes. *Neuroendocrinology* 2003; 77(1):15 - 23
108. Viru A, Tenzegolskis Z. Plasma endorphin species during dynamic exercise in humans. *Clin Physiol* 1994; 15: 73 – 79
109. Vuolteenaho O, Vakkuri O, Leppaluoto J. Wide distribution of beta-endorphin-like immunoreactivity in extrapituitary tissues of rat. *Life Sci* 1980; 27(1): 57 - 65

110. Weber E, Evans CJ, Chang JK, Barchas JD. Antibodies specific for alpha-N-acetyl-beta-endorphins: radioimmunoassays and detection of acetylated beta-endorphins in pituitary extracts. *J Neurochem.* 1982; 38(2): 436 - 447
111. Wiedemann K, Teschemacher H. β -Endorphin immunoreactive materials in human plasma determined by a multiple radioimmunoassay system. *Life Sci (Suppl.I)* 1983; 33: 89 – 92
112. Wiedemann K, Teschemacher H. Determination of β -endorphin and fragments thereof in human plasma using high-performance liquid chromatography and a multiple radioimmunoassay system. *Pharmaceut Res* 1986; 3: 142 – 149
113. William RJ, Marlin DJ, Smith N, Harris RC, Haresing W, Davies-Morel MC. Effects of cool and hot humid environmental conditions on neuroendocrine responses of horses to treadmill exercise. *Vet J London-Eng-1997* 2002; 164(1): 54 - 63
114. Young E, Bronstein D, Akil H. Proopiomelanocortin biosynthesis, processing, and secretin: Functional implications. In: Herz A, Akil H, Simon EJ, (eds). *Handbook of Experimental Pharmacology 104/I (Opioids)*. Berlin: Springer, 1993: 393 – 421
115. Young EA. Induction of the intermediate lobe pro-opiomelanocortin system with chronic swim stress and beta-adrenergic modulation of this induction. *Neuroendocrinology.* 1990; 52(4):405 - 414
116. Zangen A, Nakash R, Roth-Deri I, Overstreet DH, Yadid G. Impaired release of beta-endorphin in response to serotonin in a rat model of depression. *Neuroscience* 2002; 110(3) 389 – 393
117. Zuckermann-Levin N, Tiosano D, Eisenhofer G, Bornstein S, Hochberg Z. The importance of adrenocortical glucocorticoids for adrenomedullary and physiological response to stress: a study in isolated glucocorticoid deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(12): 5920 - 5924

9. Veröffentlichungen / Vorträge

Originalarbeiten:

MSH Plasma levels in trained and untrained males undergoing moderate, submaximal and maximal exercise intensities on a rowing ergometer.

A. Schulz, U. Blumenthal, N. Katz, B. Moll and H. Teschemacher

(Zur Publikation eingereicht bei BRITISH JOURNAL OF SPORTS MEDICINE)

Influence of a 6 month training programm on plasma concentrations of ACTH, β -Endorphin immunoreactive material and β -Endorphin-(1-31) and in trained oarsmen. A.Schulz, U.Blumentahl, N.Katz and H.Teschemacher (in preparation).

Vorträge:

Einfluss anaerober Belastung auf POMC-Fragmente im Plasma von Ruderern. A.Schulz, U.Blumenthal, H.Harbach und H.Teschemacher. Werkstattberichte der Justus-Liebig-Universität Gießen 1999.

Einflüsse von intensivem Training auf die Freisetzung von β -Endorphin-Fragmenten in den Blutkreislauf bei Hochleistungsruderern – eine saisonbegleitende Studie. A.Schulz, U.Blumenthal, J.Jerosch und H. Teschemacher
Jahrestagung der süddeutschen Orthopäden 2003 in Baden Baden.

10. Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Dr. med. A.Schulz bedanken. Von der ersten Blutabnahme bis zum letzten Satz begleitete er mich auf dem Weg dieser wissenschaftlichen Arbeit. Ob per Handy an der Kasse im Baumarkt oder über eine Distanz von 800 km Entfernung stand er mir zur jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite. Als meinem Mentor bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet!

Bei Herrn Professor Dr. med. H.Teschemacher möchte ich mich besonders bedanken. Erst durch seine Unterstützung und seine Hilfestellung wurde diese Arbeit ermöglicht.

Ebenso gilt meinem Dank Frau Beate Dickopf. Als der „Engel“ im Labor stand sie mir während der gesamten Laborarbeit mit ihrer exzellenten Hilfe zur Seite.

Herrn Prof. Dr. Dr. N.Katz, Leiter des Instituts für klinische Chemie und Pathobiochemie danke ich für die Bestimmung der Laktat- und ACTH-Plasmakonzentrationen.

Der größte Dank gilt meinen Probanden, ohne deren Bereitschaft an den zahlreichen Untersuchungen teilzunehmen, wäre diese Arbeit wohl nie zustande gekommen. Im Einzelnen danke ich den Ruderern der Giessener Ruderergesellschaft von 1877 mit ihrem Trainer Ralf Hollmann und ganz besonders meinen Kommilitonen, den Studenten der Justus-Liebig-Universität Gießen. Sie ließen sich nicht nur bis zur körperlichen Erschöpfung antreiben, sondern ließen die Blutabnahmen auch während einer wichtigen Prüfungssituation über sich ergehen.

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Christian Casselmann bedanken. Nicht nur als Proband sondern auch als mein bester Freund stand er mir während der ganzen Arbeit zu jeder Tages und auch vielen Nachtzeiten zur Seite.

An dieser Stelle möchte ich mich noch bei den Personen bedanken, die mich auf verschiedenste Art und Weise, wie zum Beispiel stundenlanges Diktieren von scheinbar endlosen Zahlenreihen, durch „Bekochen“, durch Leihen von einem Laptop oder durch exzellentes Korrekturlesen unterstützten.

Abschließend danke ich meinen Eltern, die mir nicht nur wiederholte Neuanschaffungen von Computern großzügig spendierten, sondern mich auch während meines ganzen Studiums unterstützten.

11. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Blumenthal
Vorname:	Ulrich
Geburtsdatum:	04.06.1975
Geburtsort:	Bonn
Eltern:	Barbara Blumenthal, Hausfrau Heinrich Blumenthal, Bauingenieur im Ruhestand
Familienstand:	ledig
Konfession:	katholisch

Schulbildung:

1981-1985	Johann-Lemmerz-Grundschule, Königswinter
1985-1991	Gymnasium am Petersberg, Königswinter
1991-1994	Beethoven-Gymnasium, Bonn

Zivildienst:

1994-1995	Johanniter-Unfallhilfe Bonn Ausbildung: Rettungssanitäter
-----------	--

Studium:

1995- 2002	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität, Gießen
1997	Ärztliche Vorprüfung
1999	1.Staatsexamen
2001	2.Staatsexamen
2001-2002	Praktisches Jahr Innere Medizin, Chirurgie, Anästhesie Kreiskrankenhaus Bad Hersfeld
2002	3. Staatsexamen
2004	Vollapprobation

Beruflicher Werdegang:

2003-2004	Arzt im Praktikum Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin Ernst-Moritz-Arnd-Universität, Greifswald Leiter: Prof. Dr. med. M.Wendt
Seit 07/2004	Assistenzarzt Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin Ernst-Moritz-Arnd-Universität, Greifswald

.....
Ulrich Blumenthal